

COLLECTION GRENOBLE SCIENCES
DIRIGÉE PAR JEAN BORNAREL

BIODÉGRADATIONS ET MÉTABOLISMES

LES BACTÉRIES POUR LES TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT

Jean PELMONT



BIODÉGRADATIONS ET MÉTABOLISMES

LES BACTÉRIES POUR LES TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT

Grenoble Sciences

Grenoble Sciences poursuit un triple objectif :

- réaliser des ouvrages correspondant à un projet clairement défini, sans contrainte de mode ou de programme,
- garantir les qualités scientifique et pédagogique des ouvrages retenus,
- proposer des ouvrages à un prix accessible au public le plus large possible.

Chaque projet est sélectionné au niveau de Grenoble Sciences avec le concours de referees anonymes. Puis les auteurs travaillent pendant une année (en moyenne) avec les membres d'un comité de lecture interactif, dont les noms apparaissent au début de l'ouvrage. Celui-ci est ensuite publié chez l'éditeur le plus adapté.

(Contact : Tél. : (33)4 76 51 46 95 - E-mail : Grenoble.Sciences@ujf-grenoble.fr)

Deux collections existent chez EDP Sciences :

- la ***Collection Grenoble Sciences***, connue pour son originalité de projets et sa qualité
- ***Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques***, collection présentant des thèmes de recherche d'actualité, traités par des scientifiques de premier plan issus de disciplines différentes.

Directeur scientifique de Grenoble Sciences

Jean BORNAREL, Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1

Comité de lecture pour "Biodégradations et métabolismes"

- ♦ **Paulette VIGNAIS**, Directrice de recherche CNRS au CEA de Grenoble
- ♦ **Pierre CAUMETTE**, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour
- ♦ **Yves JOUANNEAU**, Directeur de recherche CNRS au CEA de Grenoble
- ♦ **Philippe NORMAND**, Professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon

Grenoble Sciences est soutenu par **le Ministère de l'Éducation nationale**
le Ministère de la Recherche et **la Région Rhône-Alpes**
Grenoble Sciences est rattaché à l'**Université Joseph Fourier de Grenoble**

Réalisation et mise en pages : ***Centre technique Grenoble Sciences***

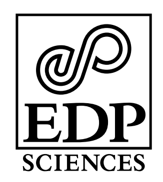
Illustration de couverture : ***Alice GIRAUD***

ISBN 2-86883-745-X

BIODÉGRADATIONS ET MÉTABOLISMES

LES BACTÉRIES POUR LES TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT

Jean PELMONT



17, avenue du Hoggar
Parc d'Activité de Courtabœuf, BP 112
91944 Les Ulis Cedex A, France

Ouvrages Grenoble Sciences édités par EDP Sciences

Collection Grenoble Sciences

Chimie. Le minimum à savoir *(J. Le Coarer)* • Electrochimie des solides *(C. Déportes et al.)* • Thermodynamique chimique *(M. Oturan & M. Robert)* • Chimie organométallique *(D. Astruc)* • De l'atome à la réaction chimique *(sous la direction de R. Barlet)*

Introduction à la mécanique statistique *(E. Belorizky & W. Gorecki)* • Mécanique statistique. Exercices et problèmes corrigés *(E. Belorizky & W. Gorecki)* • La cavitation. Mécanismes physiques et aspects industriels *(J.P. Franc et al.)* • La turbulence *(M. Lesieur)* • Magnétisme : I Fondements, II Matériaux et applications *(sous la direction d'E. du Trémolet de Lacheisserie)* • Du Soleil à la Terre. Aéronomie et météorologie de l'espace *(J. Lilensten & P.L. Blelly)* • Sous les feux du Soleil. Vers une météorologie de l'espace *(J. Lilensten & J. Bornarel)* • Mécanique. De la formulation lagrangienne au chaos hamiltonien *(C. Gignoux & B. Silvestre-Brac)* • Problèmes corrigés de mécanique et résumés de cours. De Lagrange à Hamilton (*C. Gignoux & B. Silvestre-Brac*) • La mécanique quantique. Problèmes résolus, T. 1 et 2 *(V.M. Galitsky, B.M. Karnakov & V.I. Kogan)* • Analyse statistique des données expérimentales *(K. Protassov)* • Description de la symétrie. Des groupes de symétrie aux structures fractales *(J. Sivardière)* • Symétrie et propriétés physiques. Du principe de Curie aux brisures de symétrie *(J. Sivardière)*

Exercices corrigés d'analyse, T. 1 et 2 *(D. Alibert)* • Introduction aux variétés différentielles *(J. Lafontaine)* • Analyse numérique et équations différentielles *(J.P. Demailly)* • Mathématiques pour les sciences de la vie, de la nature et de la santé *(F. & J.P. Bertrandias)* • Approximation hilbertienne. Splines, ondelettes, fractales *(M. Attéia & J. Gaches)* • Mathématiques pour l'étudiant scientifique, T. 1 et 2 *(Ph.J. Haug)*

Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques *(J. Pelmont)* • Enzymes. Catalyseurs du monde vivant *(J. Pelmont)* • La plongée sous-marine à l'air. L'adaptation de l'organisme et ses limites *(Ph. Foster)* • Endocrinologie et communications cellulaires *(S. Idelman & J. Verdetti)* • Eléments de biologie à l'usage d'autres disciplines *(P. Tracqui & J. Demongeot)* • Bioénergétique *(B. Guérin)* • Cinétique enzymatique *(A. Cornish-Bowden, M. Jamin & V. Saks)*

L'Asie, source de sciences et de techniques *(M. Soutif)* • La biologie, des origines à nos jours *(P. Vignais)* • Naissance de la physique. De la Sicile à la Chine *(M. Soutif)* • Le régime oméga 3. Le programme alimentaire pour sauver notre santé *(A. Simopoulos, J. Robinson, M. de Lorgeril & P. Salen)* • Gestes et mouvements justes. Guide de l'ergomotricité pour tous *(M. Gendrier)*

Listening Comprehension for Scientific English *(J. Upjohn)* • Speaking Skills in Scientific English *(J. Upjohn, M.H. Fries & D. Amadis)* • Minimum Competence in Scientific English *(S. Blattes, V. Jans & J. Upjohn)*

Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques

Radiopharmaceutiques. Chimie des radiotraceurs et applications biologiques *(sous la direction de M. Comet & M. Vidal)* • Turbulence et déterminisme *(sous la direction de M. Lesieur)* • Méthodes et techniques de la chimie organique *(sous la direction de D. Astruc)* • L'énergie de demain. Techniques - Environnement - Economie *(sous la direction de J.L. Bobin, E. Huffer & H. Nifenecker)*

Avertissement

Cet ouvrage s'adresse aux chercheurs, ingénieurs et étudiants intéressés par le rôle des bactéries dans la défense de l'environnement et le mécanisme biochimique des biodégradations de substances polluantes variées. Pour tenter de présenter un aperçu du problème à partir de la masse énorme des informations sur le sujet, souvent dispersées parmi les sources nombreuses éparpillées dans les publications scientifiques, il a fallu s'appuyer sur les notions fondamentales en biochimie métabolique, en enzymologie et en microbiologie. Il n'était pas question de faire double emploi avec les traités généraux qui sont souvent excellents et bien adaptés à la formation scientifique. Il convenait donc de rester dans un cadre modeste en renonçant à toute tentative de réaliser un essai encyclopédique, qui de toute façon aurait été hors de portée de l'auteur.

La difficulté est vite apparue de trouver les limites entre les données de base et les rappels jugés indispensables. Aussi a t-on ajouté à la fin des quatorze chapitres un glossaire assez volumineux pour accompagner les rubriques traitées, en rappelant les définitions et propriétés essentielles. On peut estimer néanmoins que cet ouvrage ne conviendra qu'aux étudiants ayant l'expérience d'au moins trois années de cursus universitaire avec un bagage de biochimie et de microbiologie. Par contre les connaissances de chimie requises restent simples et le programme du Premier Cycle suffira généralement. Le but est de créer un outil utile pour les différents spécialistes intéressés par la défense de l'environnement et les biodégradations, afin de leur permettre de se documenter rapidement sur des sujets qui sortent un peu de leur domaine habituel. L'idéal serait évidemment d'apporter des idées qui pourraient enrichir leur travail. On a donc pris soin d'apporter une bibliographie assez abondante, arrêtée sauf quelques exceptions à la fin 2002, et il a fallu naturellement effectuer des choix assez arbitraires. La facilité d'accès à Internet et aux grandes bases de données fait que les informations peuvent être rapidement collectées ou retrouvées, notamment par *Medline*. On a donc privilégié les références trouvées dans les journaux dont on peut se procurer en un temps très court le contenu des articles en ligne. Il a paru inutile d'introduire des adresses de sites Internet, parfois volatiles, que chacun peut se procurer en toute liberté avec les moteurs de recherche du type *Google*.

L'intervention des bactéries dans les biodégradations a été privilégiée, parce qu'elle est en général à la fois essentielle et bien documentée. Ce choix comporte une part d'arbitraire, puisque les champignons, levures et autres ensembles d'acteurs apportent leur part. Il y a donc été fait parfois allusion dans plusieurs rubriques où cela était indispensable.

Introduction

Les données du problème

Comment les bactéries éliminent-elles les déchets de l'activité humaine ? Le thème de ce livre est la biochimie du nettoyage de l'environnement qu'elles effectuent. Le problème est replacé dans le cadre des grands cycles naturels. Ils nous aident à mieux comprendre comment les procédés mis en jeu dans le recyclage des substances naturelles ont été adaptés et mis au service de l'élimination des composés artificiels, c'est-à-dire la **bioremédiation.**

L'accumulation de rejets de toutes sortes dans l'environnement est devenue un sujet de préoccupation majeure depuis plusieurs décennies. Elle a donné lieu à une forte prise de conscience dans les pays développés qui en sont les premiers responsables. La course pourrait sembler perdue d'avance au vu de la formidable progression des activités industrielles, de la consommation et du développement de l'agriculture intensive. La pollution va des emballages aux produits chimiques utilisés comme pesticides et herbicides, en passant par les nitrates, les hydrocarbures et les métaux lourds. Les micro-organismes contribuent largement à les détruire ou à les neutraliser malgré leurs limites. Tous les êtres vivants participent à des degrés divers au recyclage des matières organiques et minérales de l'environnement. Par leur aptitude à coloniser tous les milieux, les micro-organismes viennent au premier rang. Bactéries, champignons, microalgues et protistes forment une gigantesque usine chimique planétaire dont les produits se propagent tout au long des chaînes nutritionnelles. Un premier choix a été de ne considérer majoritairement que les bactéries, ou plus exactement les procaryotes en général, c'est-à-dire les protéobactéries ou bactéries au sens strict, les cyanobactéries et les archaebactéries. Pourquoi cette limitation ? Les procaryotes sont presque toujours en première ligne. Ce sont les organismes les plus simples dont on connaît plutôt bien la machinerie métabolique et assez souvent la génétique. Les mécanismes régulateurs sont moins complexes que chez les eucaryotes mais peuvent mettre en jeu un bouleversement de l'expression de nombreux gènes qui n'est pas sans rappeler les différenciations cellulaires des organismes plus évolués. La présence des procaryotes est universelle et leur participation aux grands cycles naturels est essentielle. Parmi les bactéries du sol se trouvent les actinomycètes aux potentialités particulièrement riches et complexes qui excellent en même temps dans l'art de faire des antibiotiques. L'extrême versatilité de tous ces organismes et leur faculté d'adaptation en font des acteurs très actifs dans la lutte contre les pollutions. Ce livre en est une première approche.

Depuis les années 1960 a paru une abondante littérature scientifique sur les biodégradations lorsque les chercheurs, au départ incrédules, se sont aperçus que de nombreux produits organiques jugés toxiques ou rébarbatifs comme le benzène, les phénols, le pétrole brut et autres, étaient effectivement dégradés activement par les bactéries, parfois avec la collaboration d'autres organismes dont les levures. Les résultats ne sont accessibles en général que dans des revues dispersées et spécialisées. Une pollution peut avoir des causes naturelles comme artificielles. Pour lutter contre ses effets pervers, il est bon de connaître les mécanismes de son élimination qui peut s'opérer parfois spontanément par oxydation à l'air, hydrolyse ou destruction photochimique. La microflore de l'environnement s'est habituée à traiter les polluants naturels par des facteurs enzymatiques appropriés sélectionnés au cours des périodes géologiques. La végétation est une des premières responsables de l'émission d'une immense variété de substances, des terpènes, flavonoïdes, alcaloïdes et autres composés qui sont des déchets ou des agents de défense contre les autres organismes. L'industrie humaine n'a fait que compliquer les choses en introduisant des molécules qui n'existaient pas auparavant dans la nature. On désigne ces composés artificiels sous le vocable de **xénobiotiques**. Il peut arriver qu'un xénobiotique ne soit qu'un "analogue" qui ne diffère d'un composé naturel que par un détail de sa formule chimique le rendant acceptable par les enzymes des micro-organismes. Le xénobiotique devenu biodégradable est traité comme un substrat naturel et son élimination est possible si les réactions du métabolisme en acceptent tous les intermédiaires. Dans les cas les plus favorables, la substance étrangère est minéralisée, c'est-à-dire transformée en gaz carbonique, ammoniac et eau. Un cas de figure très important est celui du **cométabolisme**. L'agent microbien dégrade effectivement le xénobiotique, mais ne peut pas l'utiliser seul pour sa croissance. Les transformations ont alors lieu parallèlement à celles des substrats normaux en utilisant les mêmes outils. Dans bien des cas, le cométabolisme peut avoir un caractère fortuit. Il est évidemment intéressant dans la mesure où il permet d'éliminer des produits gênants. Des complications naissent quand un xénobiotique a une action toxique sur la microflore et les plantes. Sa destruction, partielle ou non, est alors une réaction de défense, une **détoxification** du poison. La gamme des situations rencontrées est vaste, et nous en trouverons de nombreux exemples.

Dans un cadre général, un substrat donné se trouve en présence, non pas d'une entité biologique unique, mais de populations mixtes de bactéries ou d'autres espèces. Tous ces organismes apportent leurs propres potentialités. Les premières transformations sont catalysées par une espèce donnée et les produits formés sont reçus par d'autres qui prennent le relais. Des échanges ont lieu, minéralisation et détoxification sont éventuellement simultanées. C'est la situation la plus commune dans l'environnement mais aussi la plus difficile à démêler sur le plan expérimental puisqu'il n'est pas simple de reproduire artificiellement et de façon stable la cohabitation des différents acteurs. Il existe dans la littérature scientifique un grand nombre d'articles faisant état de la disparition de tel ou tel contaminant dans un milieu naturel, interprété comme l'activité d'une association microbienne (un "consortium" dans les articles anglosaxons). Ces recherches sont intéressantes et rassurent sur la nature de tel ou tel produit, mais n'apportent pas

toujours d'information précise sur les mécanismes impliqués. De plus la principale qualité d'un résultat scientifique est d'être reproductible par d'autres. En général les descriptions faites sur le terrain ne sont jamais reproduites en l'état, puisqu'il s'agit de milieux complexes variables dans le temps et l'espace. Reconnaître le caractère biodégradable d'un produit est néanmoins essentiel. Son évaluation par différentes méthodes standards, comme la *BOD**[1], est recherchée par les industriels désireux de se mettre en conformité avec la législation.

La disparition de certains polluants est conditionnée par leur solubilité, leur caractère volatil (émission dans l'atmosphère et destruction photochimique), ou leur adsorption sur les particules du sol (humus et argiles). Un produit fortement adsorbé reste plus longtemps dans le sol alors qu'un produit très soluble est entraîné rapidement vers la nappe phréatique et les cours d'eau. Ce n'est pas forcément avantageux. Un lessivage trop rapide ne laisse pas le temps aux micro-organismes du sol de s'adapter et d'entamer le nettoyage, et le produit polluant ira contaminer les rivières. La tendance plus ou moins importante à s'adsorber est mesurée par le *coefficient Koc**. Elle est réglée entre autres par la nature des molécules, leur caractère plus ou moins hydrophobe et leur ionisation. La récalcitrance intégrale de certains polluants qui résistent à toute attaque microbienne est évidemment la situation la plus néfaste et nécessite le recours, quand on le peut, à l'incinération ou au recyclage. Il s'agit principalement de certaines matières plastiques, de goudrons, de noyaux chimiques d'une stabilité exceptionnelle et d'éléments minéraux tels que les métaux : cadmium, zinc, mercure et autres. La pollution par les hydrocarbures est à l'ordre du jour. La biodégradation de bon nombre de ces composés est connue, parfois rapide et a fait l'objet d'une expérimentation très vaste. Malheureusement certains hydrocarbures, polycycliques ou à haute masse moléculaire, sont de véritables dangers. Tout le monde pense évidemment aux bitumes lourds de l'*Erika* ou du *Prestige*. La lenteur de leur élimination naturelle est telle que leur présence, longtemps après les récentes marées noires, constitue la calamité que l'on sait. Les métaux offrent un cadre à part. Lorsqu'ils sont présents sous forme d'oxydes, d'hydroxydes, de sulfures ou de combinaisons organiques, les métaux peuvent être solubilisés et entraînés par les eaux avant d'être dilués dans l'environnement. La gestion des concentrations métalliques est un problème épineux en biologie. Un chapitre montrant comment les bactéries traitent ce problème a été inclu dans ce livre, car la pollution métallique est loin d'être absente des problèmes contemporains.

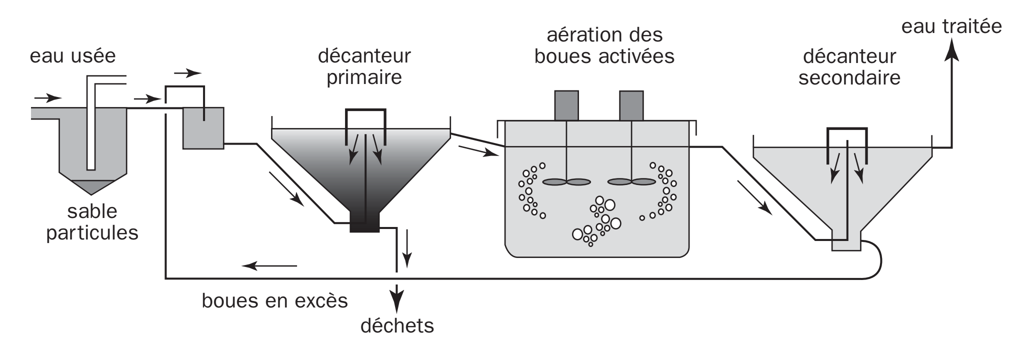
Enfin il convient de mentionner la participation des plantes dans tout ceci. Elles ne sont pas le sujet de ce livre, mais leur présence ne saurait être ignorée car leurs racines attirent dans ce qu'on appelle la rhizosphère des bactéries et des champignons avec lesquels elles collaborent activement. En outre la majorité des plantes hébergent dans leurs racines des champignons formant les mycorhizes, qui présentent eux-mêmes des interactions avec les bactéries. Limiter le sujet aux bactéries, à quelques exceptions près, est donc une première simplification qui ne doit pas faire oublier que l'environnement est un tout faisant participer un grand nombre d'organismes différents.

---

*1 - Les mots repérés par * sont définis dans le glossaire situé à la fin de l'ouvrage.*

L'ÉPURATION

La législation actuelle oblige toutes les communes à se raccorder à une station d'épuration. Certaines industries ont leur propre installation. L'épuration biologique permet de débarrasser l'eau de ses principales impuretés. Son évocation très succincte ici ne sert qu'à nous mettre dans le bain du sujet. La méthode la plus ancienne est le **lagunage**, qui utilise des plans d'eau où s'effectuent les processus naturels de dégradation et de recyclage des polluants grâce au développement de bactéries, de levures, de protozoaires et d'algues. Il s'établit une chaîne alimentaire naturelle oxygénée en surface. On utilise au besoin la capacité d'auto-épuration des terres cultivées. La méthode a l'inconvénient d'occuper des surfaces assez vastes et sa capacité de traitement est devenue trop faible pour les grandes agglomérations. Les stations d'épuration fonctionnent sur un principe similaire mais avec une plus grande efficacité. Les eaux usées sont décantées puis brassées et aérées en présence des micro-organismes qui s'agglomèrent en boues et granules destinés à sédimenter, tandis que les eaux clarifiées sont peu à peu débarrassées de leurs matières organiques dissoutes. La présence de l'oxygène est essentielle et garantit les biodégradations les plus rapides. Selon la technologie utilisée, ces cultures bactériennes peuvent être libres (**boues activées**) ou fixées (lits bactériens et biofilms). L'emploi des boues activées est le plus classique. Les micro-organismes se développent et se rassemblent en flocons ou "flocs", maintenus en suspension par brassage accompagné d'une aération. Une décantation élimine les boues, dont une partie est réinjectée en amont, le restant étant éliminé, opération qui demande souvent des solutions techniques délicates. Il existe maintenant une variété de techniques et le schéma symbolise le principe de base.



La demande en eau recyclée de haute qualité a stimulé les progrès techniques. Une économie des volumes traités est recherchée dans les villes par la séparation des eaux usées et pluviales. La charge minérale et organique d'une eau est estimée par la **MES** ou teneur en matières en suspension, et par la *DBO5** qui permet d'estimer la teneur en matière organique. La MES d'une eau urbaine ne dépasse guère 200-300 mg.L^{-1}, et la DBO5 varie de 100 à 400 mg.L^{-1}. Ces valeurs peuvent être fortement augmentées, de 10 à 50 fois à la sortie de certaines industries alimentaires (brasseries, conserveries, fromageries, abattoirs). Deux autres paramètres sont la **DCO** (demande chimique en oxygène) et le **COT** (carbone

organique total). Des mesures rapides et automatisées permettent ainsi d'évaluer la pollution. Il est généralement intéressant de pouvoir estimer la nature précise des polluants présents comme les pesticides ou les hydrocarbures. Les techniques analytiques modernes y parviennent. Parmi celles-ci figurent des enzymes immobilisées dans des électrodes polarographiques. Diverses sociétés se sont spécialisées dans la production de biocapteurs. La conception des biocapteurs s'est diversifiée et perfectionnée depuis une vingtaine d'années. La détection automatique d'une pollution permet de déclencher un système d'alerte et de commander le réglage des installations. Divers procédés ont été mis au point pour traiter certains effluents en anaérobiose, comme le *procédé UASB**.

Des efforts menés en vue de diminuer les coûts d'investissement et d'entretien ont conduit à de nombreuses améliorations dans la filtration, l'immobilisation des bactéries et l'évacuation des boues. La conduite d'une station d'épuration sur le principe de base évoqué précédemment connaît plusieurs catégories de problèmes, dont le rejet des boues ou la qualité des microbes épurateurs. La nature de ces micro-organismes est cruciale. On trouve généralement des *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* et autres espèces dont le nom reviendra fréquemment dans le courant de ce livre comme acteurs des biodégradations. L'arrivée des polluants sélectionne des espèces compétentes qui se développent plus vite que d'autres et sont capables d'échanger de l'information génétique sous forme de plasmides. On s'efforcera sans doute dans l'avenir d'introduire des bactéries génétiquement modifiées spécialisées dans le traitement de certaines pollutions. Toutes ces recherches reposent à la base sur des études expérimentales utilisant les méthodes de culture afin d'étudier les propriétés physiologiques des germes. Les méthodologies sont bien décrites dans les manuels de microbiologie pratique. Cela va du plus simple par des cultures axéniques discontinues (en *batch*) aux cultures continues en *chémostat** ou en *turbidostat**. Ces techniques ont été largement perfectionnées et automatisées. Malheureusement elles ne rendent encore compte qu'imparfaitement des conditions naturelles où de nombreuses espèces de micro-organismes sont en association et en compétition. L'étude des cultures mixtes stables se heurte à de grandes difficultés mais devrait concentrer les efforts de recherche à l'avenir.

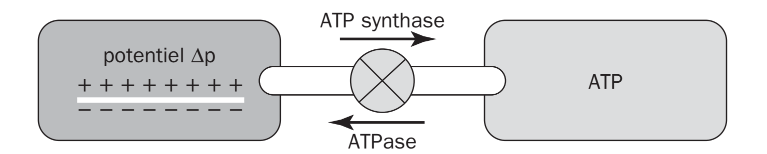
CHAPITRE 1
LA COLLECTE DE L'ÉNERGIE

Ce premier chapitre a pour objet de dresser un rappel des mécanismes énergétiques fondamentaux situés à la base des cycles naturels et de toute biodégradation. Que l'énergie soit tirée des oxydations ou de la lumière, elle apparaît invariablement sous forme d'un potentiel électrochimique membranaire ou de composés énergétiques comme l'ATP.

1 – La collecte de l'énergie

1.1 - Respirations et fermentations

Toute cellule dispose invariablement de deux réservoirs d'énergie de base, représentés par un potentiel membranaire et un stock de composés énergétiques comme l'ATP. Le potentiel est alimenté par le passage de protons préférentiellement dans un seul sens, avec pour résultat une dissymétrie de pH et de charges des deux côtés de la membrane, avec un excédent de protons et de charges positives hors du cytoplasme. L'ATP est l'archétype des molécules énergétiques dites à haut potentiel et source d'énergie chimique directe. Ces deux réservoirs communiquent par une pompe membranaire réversible, qui est l'ATPase/ATP synthase. L'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate peut générer un potentiel de membrane. Inversement ce potentiel, qui évoque celui d'un condensateur chargé, peut actionner une synthèse en retour de l'ATP. L'idée fondamentale est donc de voir que toute l'énergie immédiatement disponible pour la cellule est répartie entre ces deux réservoirs. Le **potentiel électrochimique** membranaire ou force protonmotrice (Δp) est alimenté essentiellement par les respirations et les oxydoréductions liées à la photosynthèse. De l'autre côté, le réservoir **ATP** représente les molécules à haut potentiel énergétique produites par les fermentations. Celles-ci engendrent de l'ATP en phase soluble par couplage direct avec des réactions du métabolisme. Une autre fraction d'ATP est produite par la pompe réversible qui est l'ATPase/ATP synthase. Elle permet de recharger le potentiel membranaire par l'hydrolyse de l'ATP, ou au contraire de faire une synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate au détriment du potentiel membranaire.



Ce schéma est utile aux microbiologistes et biochimistes, car il fait appel au mécanisme mis en jeu au cours de la conservation d'énergie. Les modalités sont parfois plus complexes et le mécanisme des échanges d'énergie n'est pas toujours connu

avec certitude. La notion de fermentation adoptée ici est restrictive. Dans la pratique industrielle, la récupération de produits utiles à partir d'une culture de micro-organismes est considérée comme une fermentation au sens large. L'oxydation de l'alcool en acide acétique dans la préparation du vinaigre est ainsi désignée comme une fermentation, alors qu'au sens biochimique du terme c'est le résultat d'oxydations respiratoires.

Le **potentiel membranaire** est bâti par des oxydoréductions capables de coupler le transport d'électrons avec une translocation de protons. Ce principe de conservation d'énergie est réversible. Le potentiel membranaire peut contribuer aux courants d'électrons inverses, générateurs de molécules réduites comme le NADH ou le NADPH. Il actionne de façon générale un retour des protons à travers la membrane, couplé à un certain nombre d'activités comme la rotation des flagelles ou le transport de substances et d'ions à travers la membrane. Ce sont les transports actifs dits de type 1. Ainsi la perméase du lactose dans le colibacille fait entrer simultanément une molécule de glucose et un proton. La pression exercée sur l'entrée du proton tire la molécule de lactose vers l'intérieur. La perméase agit donc comme synporteur. Si l'entrée des protons était couplée à la sortie d'une autre entité, il s'agirait d'un antiporteur. La contribution essentielle du potentiel membranaire consiste évidemment à coupler la synthèse d'ATP par phosphorylation de l'ADP grâce au retour des protons vers le cytoplasme.

Le réservoir **ATP** renferme une énergie convertible en différentes molécules à haut potentiel énergétique dont l'acétyl-coenzyme A. L'ATP actionne de nombreuses synthèses, actionne la mobilité cellulaire chez certaines espèces, ainsi que des transports actifs, notamment les *transporteurs ABC** des **bactéries**. Dans la réalité l'ATP n'est pas le seul nucléotide énergétique, mais il faut introduire en toute rigueur l'ADP, ou encore des nucléotides susceptibles d'échanger leur phosphate comme l'UDP, le CDP et le GTP. L'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate libère 32 $kJ.mol^{-1}$ dans les conditions standards. L'énergie réelle est bien supérieure (50-70 $kJ.mol^{-1}$). Elle croît avec le rapport ATP/ADP, ou mieux avec la "charge énergétique" définie par ATKINSON comme (ATP + 0,5 ADP) / (ATP + ADP + AMP). Comparable en quelque sorte à la charge d'une batterie, ce rapport serait étroitement régulé par les cellules dans une fourchette d'environ 0,85-0,95 dans les conditions normales de croissance.

On sait que la variation d'énergie libre au cours d'une oxydoréduction est donnée par la *loi de NERNST**. Une oxydation chimique quelconque devrait dégager essentiellement de la chaleur. Les biomembranes offrent un milieu hydrophobe favorable à la **conservation de l'énergie** par translocation unidirectionnelle d'entités ioniques. On admet que cette conversion s'opère avec un rendement très élevé par le canal de protéines membranaires transporteurs d'ions, animées de changements de conformation. L'énergie des oxydations est donc consacrée à des changements de conformations cycliques au sein de ces transporteurs, qui leur permettent de se charger d'un ion sur une face de la membrane, et de le rejeter de l'autre côté, créant un potentiel électrochimique.

Dans les cas les plus courants, le potentiel s'établit par une translocation de protons. Des ions sodium peuvent jouer le même rôle. Les protons, ou noyaux

d'hydrogène, ne sont pas des entités libres comme le serait un ion sodium anhydre, par exemple. En milieu aqueux, un proton est présent combiné à des molécules d'eau, sous forme H_3O^+ (ou $H_5O_2^+$ et autres), alors que dans les molécules organiques et en particulier les protéines, sous forme de groupes ionisables à caractère acide (cystéine, tyrosine, aspartate, glutamate), basique (arginine, lysine, histidine)[1]. Les transferts de protons dans les protéines se font de groupe donneur vers groupe accepteur (acide vers base). Lorsque les protons parviennent à l'extérieur, ils sont acceptés par des molécules d'eau et leur présence contribue à faire baisser le pH. Ils peuvent être aussi retenus à la surface de la membrane sous forme de charges positives échangeables. La translocation des protons revient donc à acidifier le milieu extérieur, ou à créer un excédent de charges positives, ou les deux à la fois. Le potentiel électrochimique membranaire a donc deux composantes : une acidité par rapport à l'autre face, une charge globale positive par rapport à celle-ci. La tendance qu'ont les protons à faire ce mouvement inverse dépend à la fois du pH et de la répartition asymétrique des charges. C'est pourquoi on a coutume de représenter le potentiel membranaire par une force protonmotrice, analogue à une force électromotrice, désignée par Δp ou $\Delta \mu H$, et exprimée en volts :

$$\Delta \mathbf{p} = \Delta\Psi - 2{,}3\ (RT/F)\ \Delta pH.$$

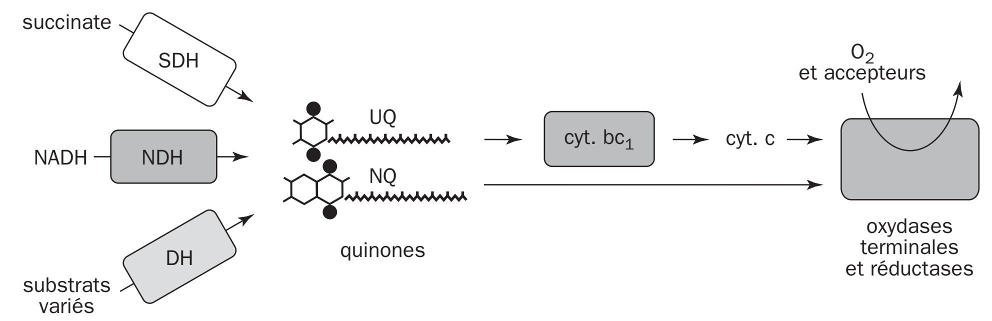
La différence de potentiel électrique $\Delta\Psi$ entre les deux faces de la membrane est positive si l'extérieur est chargé positivement par rapport au cytoplasme. La différence **ΔpH** du pH entre les deux compartiments est négative si l'extérieur est le côté le plus acide. Le coefficient 2,3 (RT/F) vaut à peu près 0,059 volt. Selon ces conventions de signe, une Δp positive tend à faire entrer des protons et donc à faire synthétiser de l'ATP. Beaucoup d'auteurs préfèrent l'exprimer en millivolts. Elle est couramment de 200 à 250 millivolts dans les systèmes biologiques. On voit tout de suite que ΔpH peut être nul si toute la force protonmotrice est établie par une différence de charges entre les deux faces de la membrane qui peut provenir d'une distribution inégale d'ions sodium, potassium ou autres. Des interconversions plus compliquées peuvent avoir lieu par le jeu des mouvements de molécules et d'ions chargés à travers la membrane, soit par diffusion, soit à l'aide de transporteurs spécifiques. Toute substance rendant la membrane perméable à certains ions peut donc avoir un effet découplant. C'est le cas des ionophores et des protonophores. Par exemple la valinomycine transporte spécifiquement les ions potassium à travers la membrane et agit comme découplant si ces ions sont présents. Ce phénomène peut ralentir le développement de la microflore et retarder les biodégradations, quand sont répandues certaines substances phénoliques qui ont un tel effet découplant.

Les **oxydations respiratoires** ont donc une fonction cruciale dans l'établissement d'un potentiel membranaire. Les oxydations liées à la photosynthèse fonctionnent

---

1 - *Rappel - la notion d'acide ou de base donnée ici correspond aux définitions de Broensted, très commode pour les biochimistes. Un acide est donneur de proton, une base un accepteur. Par exemple l'acide glutamique se dissocie réversiblement en acide glutamique ↔ glutamate⁻ + H⁺, le proton étant accepté par une base (molécule organique, eau).*

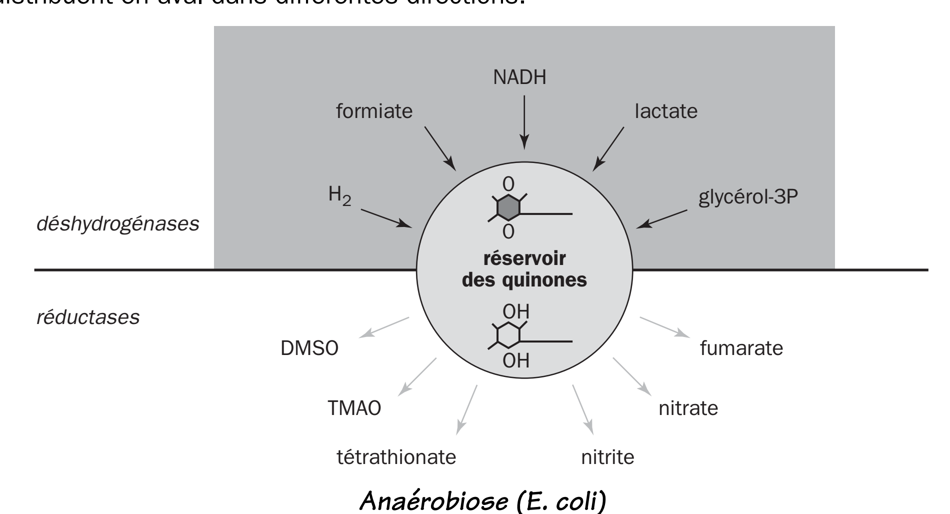
sur le même principe. La figure symbolise le modèle de base d'une chaîne de transporteurs d'électrons débouchant sur un accepteur final qui est supposé ici être le dioxygène.



Chaînes respiratoires

Les rectangles ombrés sont des sites de conservation d'énergie. Ils correspondent à des systèmes enzymatiques complexes où le passage des électrons contribuent à bâtir un potentiel membranaire par la translocation à sens unique de protons. On y voit la **NADH déshydrogénase** (NDH) qui est un système complexe avec un composant flavinique et des noyaux fer-soufre, le **cytochrome bc_1** et la **cytochrome c oxydase** terminale ou cytochrome aa_3[2], remplaçable en anaérobiose par des réductases (comme la nitrate réductase).

Vers les quinones respiratoires de la membrane convergent les électrons venant du NADH, du succinate et de donneurs variés par le canal de diverses déshydrogénases ou de l'hydrogénase, systèmes enzymatiques qui ont tous des noyaux fer-soufre dans leur structure. Les quinones forment un réservoir d'électrons qu'elles distribuent en aval dans différentes directions.



Anaérobiose (E. coli)

2 - *Une nomenclature traditionnelle mais vieillie appelle "complexe I" de la mitochondrie animale la NADH déshydrogénase (NDH), "complexe II" la SDH, "complexe III" le bc_1 et "complexe IV" la cytochrome c oxydase.*

Elles canalysent les électrons vers une quinone respiratoire dissoute dans la phase lipidique membranaire. En bas du schéma sur l'anaérobiose figurent différents accepteurs. Les réductases correspondantes ont également des noyaux fer-soufre et sont éventuellement associées à des cytochromes. L'accepteur le plus favorable est le nitrate (E'° = + 420 mV). D'autres ont un potentiel plus bas, comme le diméthylsulfoxyde (DMSO, E'° = + 160 mV), le triméthylamine-N-oxyde (TMAO, E'° = + 130 mV) et le fumarate (E'° = + 30 mV). La quinone respiratoire n'est plus une ubiquinone (E'° = + 100 mV), mais une **ménaquinone** à potentiel plus bas (E'° = – 74 mV).

Les ubiquinones (une des plus communes est l'ubiquinone-8 ou UQ-8, de potentiel E'° = + 100 mV), sont des molécules très lipophiles[3], en excès dans la membrane par rapport aux autres transporteurs d'électrons. Une de leurs caractéristiques essentielles est de pouvoir échanger les électrons un à un en passant par un stade intermédiaire radicalaire ou semiquinone.

quinol — $e^- + 2\,H^+$ — semiquinone — e^- — quinone

Ubiquinone-8

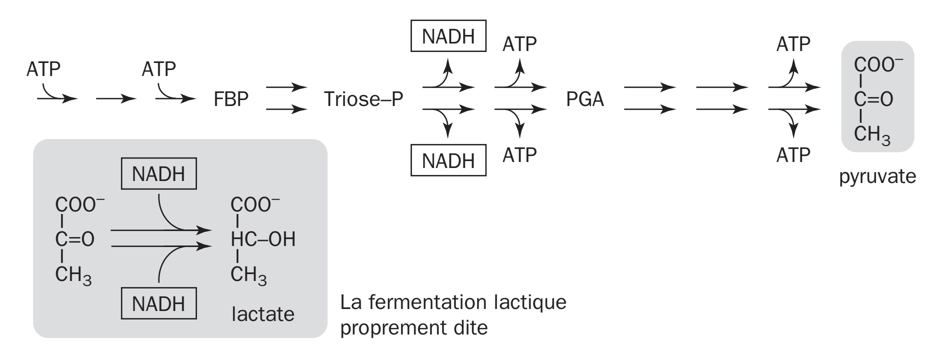
En absence d'oxygène dans les respirations dites anaérobies, les ubiquinones sont souvent remplacées par des **naphtoquinones** (NQ), appelées aussi ménaquinones, au comportement similaire mais avec un potentiel redox plus bas. Leur forme réduite, ou ménaquinol, n'est pas réoxydée par un cytochrome bc_1, car ces derniers sont caractéristiques des chaînes aérobies, sauf chez certains phototrophes où ils sont des pièces essentielles dans les échanges d'énergie.

Le complexe bc_1 sera décrit plus loin. Leur équivalent chez les cyanobactéries s'appelle b_6f. La participation d'un bc_1 aux oxydoréductions n'est pas absolument générale. Dans certaines chaînes respiratoires bactériennes s'effectue une oxydation directe des quinols par l'oxydase terminale, dont nous retrouverons plus loin des exemples.

3 - *Solubles dans le pentane ou l'hexane.*

1.2 - LE RÔLE DES FERMENTATIONS

Les mécanismes respiratoires pratiqués avec l'oxygène ou des accepteurs de remplacement sont généralement les meilleures sources d'énergie pour les cellules. Mais quand aucune respiration n'est possible, une fermentation s'impose et produit de l'ATP en phase soluble, sans passer par un potentiel membranaire. Les fermentations consomment beaucoup de matières premières, les oxydations sont très incomplètes et libèrent en excès des produits caractéristiques. Leur importance directe dans les biodégradations est parfois secondaire quand les conditions nécessaires sont éloignées des conditions réelles. Elles participent cependant au recyclage de la matière organique et interviennent au moins indirectement au nettoyage de l'environnement. Le principe de base d'une fermentation est illustré de façon exemplaire par la très classique fermentation lactique. La voie glycolytique ou voie EMP[4] transforme une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, consomme 2 ATP mais en produit 4. Il y a 2 oxydations qui libèrent au total 4 électrons emportés dans 2 molécules de NADH.

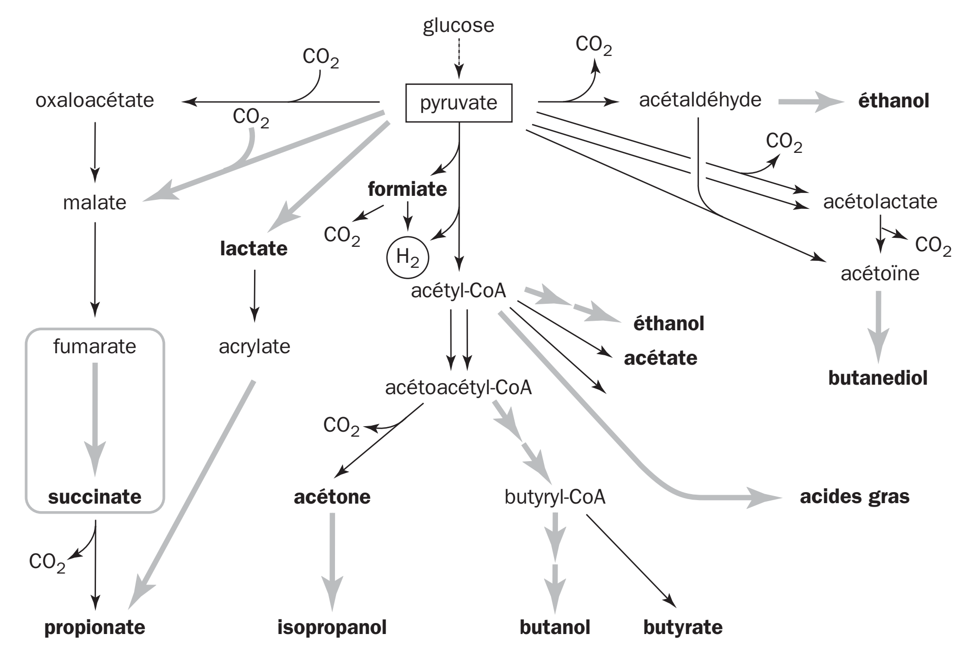


La voie glycolytique ordinaire

Tout le problème des fermentations est de réoxyder le NADH. Si les oxydations se poursuivaient au-delà du pyruvate, il y aurait davantage de NADH produit. La fermentation lactique fait deux choses essentielles : réoxyder tout le NADH et obtenir un gain net en ATP. Le bilan est équilibré, mais le résultat est une production d'énergie modeste pour un grand gâchis de matière première. Dans la réalité il y a un peu moins de lactate formé, soit 1,8 à 1,9 moles par mole de glucose, parce qu'une partie du carbone est prélevée aux stades FBP, PGA et pyruvate, pour les synthèses carbonées de la cellule. Le tableau suivant n'est qu'un simple rappel pour montrer les fermentations effectuées à partir du pyruvate, les flèches épaissies désignant des phases réductrices produisant 2 électrons par mole.

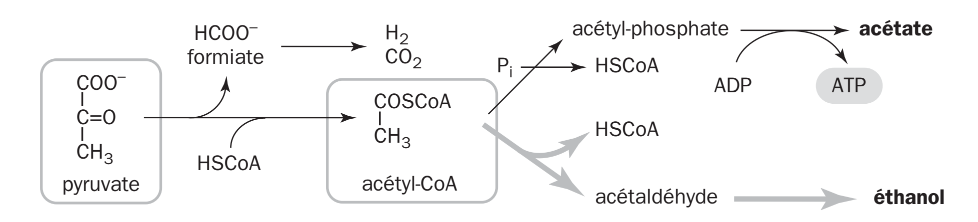
---

4 - Voie d'EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS ; FDP : fructose-1,6-bisphosphate ; Triose-P : dihydroxyacétone-phosphate et 3-phosphoglycéraldéhyde ; PGA : acide 3-phosphoglycérique. Les voies classiques sont l'EMP, la voie des pentose-phosphates et celle d'ENTNER-DOUDOROFF.



Grandes fermentations à partir du pyruvate

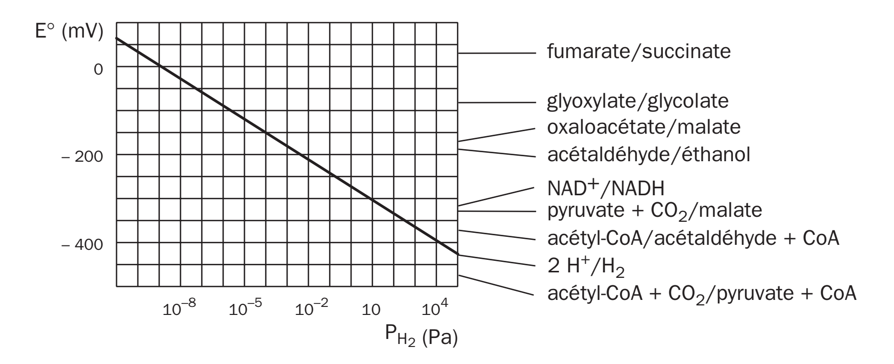
La principale difficulté d'un métabolisme de fermentation est de réoxyder entièrement le NADH ou équivalent formé au cours des oxydations qui doivent fournir une énergie rentable. Le métabolisme cellulaire doit être compatible avec ces exigences. C'est pourquoi les voies de fermentation sont en général ramifiées, celles du lactate de *Lactobacillus* ou de l'éthanol dans la levure étant plutôt des exceptions. La multiplicité des voies autorise une meilleure adaptation aux conditions comme on peut s'en rendre compte par l'exemple très simple de la transformation du pyruvate par le colibacille en anaérobiose. Les produits sont l'éthanol, l'acétate et le formiate, qui est transformé en CO_2 et H_2. Seule est productrice d'ATP la voie de l'acétate.



Le passage du pyruvate à l'acétyl-coenzyme A est une oxydation classique décrite dans tous les manuels, mais elle a ici une particularité : les électrons sont évacués sous forme d'hydrogène gazeux par l'intermédiaire du formiate. Seule la voie passant par l'acétyl-phosphate est énergétique. Elle ne permet pas à la cellule de réoxyder le NADH produit avant la fabrication du pyruvate. La seconde voie s'en charge. Un aiguillage au niveau de l'acétyl-CoA va orienter le métabolisme plutôt

vers une voie ou l'autre en fonction des impératifs cellulaires du moment. Il y a finalement quatre produits de fermentation en proportions variables : l'hydrogène, le gaz carbonique, l'acide acétique et l'éthanol. L'équilibrage entre réoxydation du NADH et production d'énergie n'est pas le seul impératif. La cellule a besoin de certains substrats carbonés de départ pour ses synthèses. Par exemple l'oxaloacétate est le précurseur de plusieurs acides aminés dont l'aspartate, et le succinate est à l'origine des porphyrines. Une voie de fermentation peut donc en profiter pour produire au passage de tels précurseurs. Elle est dite voie **anaplérotique**. Le petit détournement ainsi effectué ne compromet pas la fermentation proprement dite puisque la matière première est disponible en grande quantité.

Les fermentations produisent éventuellement de grandes quantités de gaz et de produits volatils tels que gaz carbonique, hydrogène, des alcools, des acides carboxyliques à courte chaîne... Les émanations s'ajoutent aux produits formés par d'autres routes, comme l'ammoniac et H_2S. L'**hydrogène** gazeux est un vecteur extrêmement important dans l'environnement mais ne s'accumule pas, car il diffuse facilement vers la surface du sol et des eaux. En outre il est rapidement réoxydé en aérobiose par des germes qui l'utilisent comme substrat énergétique. Enfin une concentration trop forte en H_2 abaisse le potentiel redox du milieu à des valeurs basses et se montre inhibitrice sur de nombreuses réactions de fermentation. Le diagramme de SCHINK **[1]** indique le potentiel redox à pH 7 de l'hydrogène en fonction de sa pression partielle exprimée en pascals (Pa). Le potentiel standard à pH 7 de plusieurs couples d'oxydoréduction a été repéré. On voit que le **potentiel de l'hydrogène** est plus bas que la majorité d'entre eux.



Variations du potentiel de l'hydrogène

La ligne de démarcation entre fermentation et oxydation respiratoire n'est pas toujours évidente. Le meilleur exemple est celui de la fumarate réductase membranaire sur laquelle nous reviendrons par la suite. Le fumarate est utilisé comme accepteur et fait du succinate par un mécanisme qui s'accompagne d'une translocation de protons. Un autre cas subtil est celui d'une apparente fermentation propionique par des espèces anaérobies strictes telles que *Propionigenium modestum* et *Veillonella alcalescens*. La première est une bactérie marine, la seconde se rencontre dans la plaque dentaire. DIMROTH a montré en 1982 que *Propiogenium* tirait son énergie d'un système inédit **[2]**.

On la cultive sur succinate dans un milieu contenant 20 g.L^{-1} de NaCl. La transformation du succinate peut s'écrire [5] :

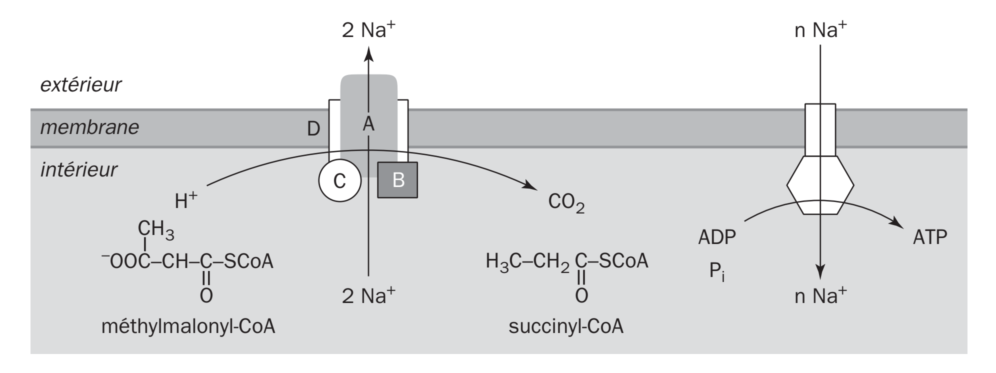
succinate + propionyl-CoA ⟶ succinyl-CoA + propionate (1)

succinyl-CoA ⟶ (R)-méthylmalonyl-CoA (2)

(R)-méthylmalonyl-CoA ⟶ (S)-méthylmalonyl-CoA (3)

(S)-méthylmalonyl-CoA + H^+ ⟶ propionyl-CoA + CO_2 (4)

Les enzymes catalysant ces réactions sont une coenzyme A transférase (1), la méthylmalonyl-CoA mutase (2), une racémase (3) et la méthylmalonyl-CoA décarboxylase (4). La réaction (1) fait entrer du succinate, et le propionate est rejeté au-dehors comme produit de la fermentation. Or ce sont deux charges négatives qui entrent pour une seule qui sort. Conséquence : une charge négative supplémentaire du côté interne de la membrane. La réaction (4) est la partie la plus intéressante. Elle consomme un proton du côté interne. Elle fonctionne avec la **biotine** comme cofacteur et couple la décarboxylation du substrat avec une **translocation d'ions sodium** vers l'extérieur de la cellule. Les bactéries font donc un gradient d'ions sodium comme d'autres feraient un gradient de H^+. La décarboxylation est "exergonique" [6] ($\Delta E'° = -30$ kJ.mol^{-1}). Comment la cellule récupère-t-elle l'énergie correspondante ? Par une translocation en retour d'ions sodium et synthèse d'ATP. Le passage des ions sodium en sens inverse actionne une ATP synthase très comparable à l'enzyme courante (dite de type F_0F_1 qui utilise les protons), et le résultat est donc une synthèse d'ATP par l'intermédiaire du potentiel membranaire. Le gradient de sodium est effaçable expérimentalement par la nigéricine et la monensine. On a montré avec des membranes isolées que le système pouvait fonctionner dans les deux sens ! La décarboxylase représente un modèle qu'on retrouve dans plusieurs espèces **[3]**.



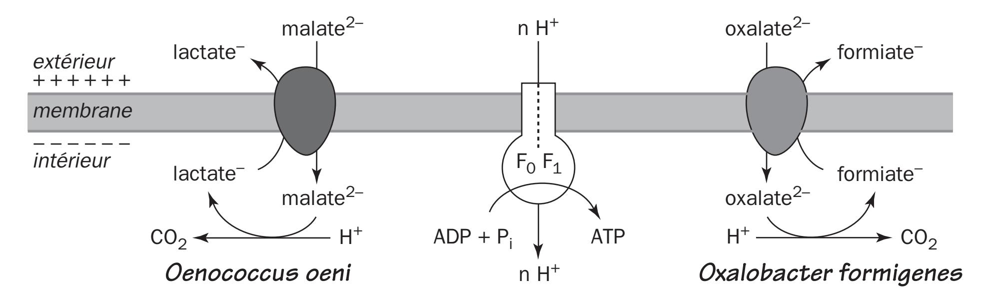
Méthylmalonyl-CoA décarboxylase (P. modestum)

Les fermentations s'accompagnent parfois de l'entrée et de la sortie de molécules organiques ioniques par le jeu de transporteurs, avec pour résultat un déséquilibre

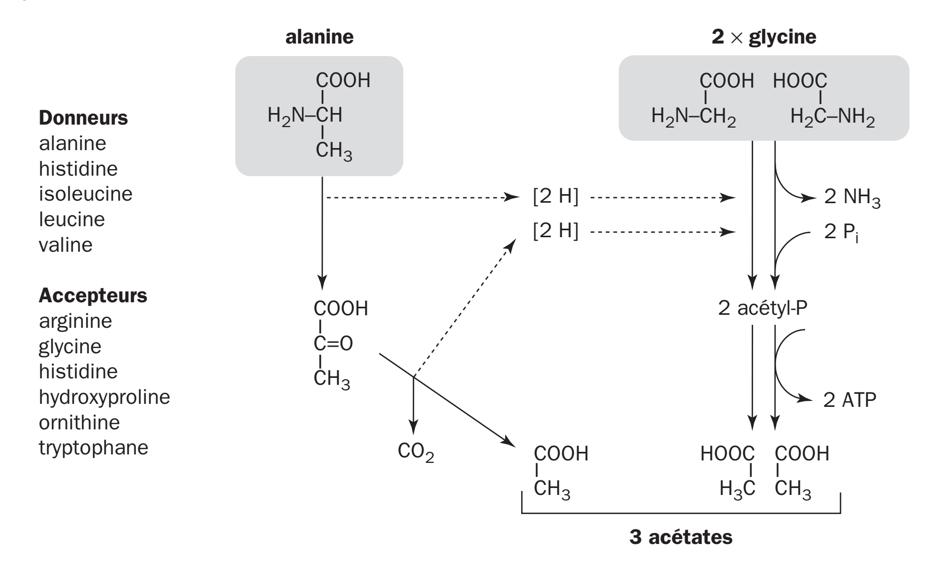
5 - *La notation R,S des configurations carbonées est celle des chimistes. La notation usuelle D,L est encore traditionnellement admise dans certains cas, par exemple pour désigner les acides aminés.*

6 - *C'est-à-dire productrice d'énergie libre.*

des charges de part et d'autres de la membrane et naissance d'un potentiel. Un exemple classique est fourni par la fermentation malolactique[7] qui comporte en même temps une oxydation du malate en acétate et une décarboxylation en lactate dans *Oenococcus oeni*. La figure montre comment l'échange des deux produits crée une dissymétrie de charge. Un phénomène du même genre se produit dans *Oxalobacter formigenes* dans la transformation de l'oxalate. L'excédent extérieur de charges positives permet d'actionner la synthèse d'ATP par l'ATP synthase F_0F_1.



Terminons cette évocation des fermentations par les bactéries Gram-positives du genre *Clostridium*. Ce sont des germes sporulants présents dans tous les milieux, strictement anaérobies, très sensibles à O_2, totalement dépourvus de transporteurs d'électrons comme les cytochromes. Leurs ressources énergétiques sont souvent fondées sur des fermentations sophistiquées. L'une d'elles est la **réaction de STICKLAND**.



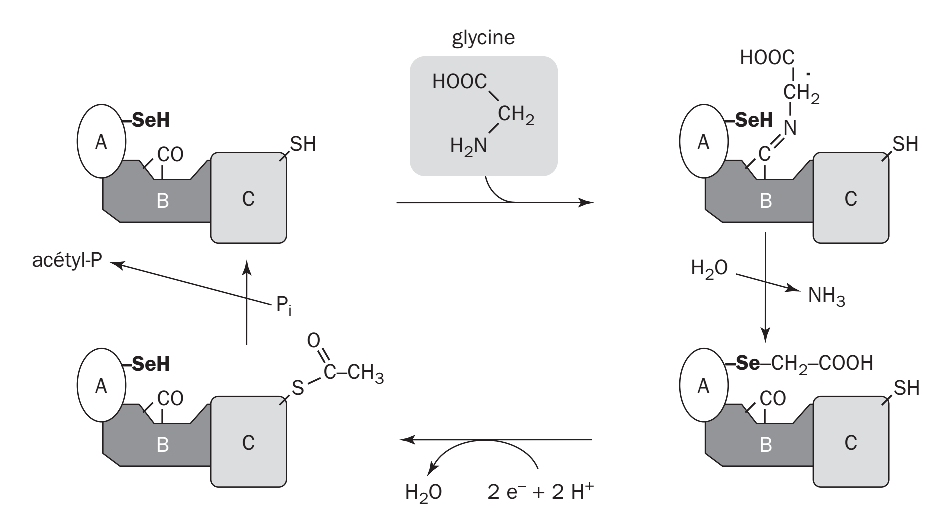
Fermentation de STICKLAND

---

7 - *La fermentation malolactisque est d'importance dans la maturation des vins, dont elle abaisse l'acidité et assouplit le goût. Elle doit se produire immédiatement après la fermentation alcoolique, de façon à pouvoir réaliser rapidement la stabilisation biologique du vin, de 10 à 25°C, à pH 3-3,5, en présence d'éthanol de 10 à 13% en V. On peut inhiber le processus par SO_2, l'accélérer par des bactéries lyophilisées.*

Un acide aminé, comme la *L*-alanine, est oxydé par déshydrogénases génératrices de NADH, symbolisé par [2H]. La réoxydation du NADH se fait par une voie réductrice portant sur 2 molécules d'un autre acide aminé, ici la glycine. L'énergie est récupérée sous forme d'ATP à partir de l'acétyl-phosphate comme indiqué par le tableau ci-dessus.

Le bilan entre le donneur alanine et l'accepteur glycine est donc ici de 3 molécules d'acide acétique formées et de 2 ATP. Plusieurs acides aminés pouvant intervenir comme donneurs ou accepteurs ont été indiqués. Nous retrouvons ici l'acétate comme un produit de fermentation. Une classe particulière de bactéries dites acétogènes font de l'acide acétique comme principal produit de leur activité, mais se détachent par des caractères particuliers. Dans ce groupe figurent des bactéries du genre *Clostridium*. Nous examinerons les acétogènes dans un chapitre ultérieur. Une phase critique de ce métabolisme est la réduction désaminante de la glycine par la **glycine réductase**. L'enzyme de *Clostridium sticklandii* n'a pas d'équivalent ailleurs, et l'une de ses particularités est de fonctionner à l'aide de sélénium. On y trouve plusieurs parties appelées A, B et C, qui ont chacune un pôle réactif caractéristique. La partie A (17,1 kDa) contient un thiol essentiel et surtout un résidu de **sélénocystéine [4]**. La protéine B renferme du pyruvate comme cofacteur attaché par lien covalent. Le site réactif essentiel est le carbonyle (C=O) du pyruvate. La protéine C est un tétramère de formule $\alpha_2\beta_2$ (α : 58 kDa, β : 49 kDa) **[5]**. Elle contient un thiol indispensable et catalyse la dernière étape de la réaction. La figure ci-dessous représente le cycle de façon simplifiée.



Cycle de la glycine réductase

Le substrat est chargé sur la protéine B, forme une liaison covalente temporaire de type cétimine, appelée aussi base de SCHIFF. Celle-ci est hydrolysée et il y a transfert sur la sélénocystéine de la protéine A, avec désamination. Une étape réductrice sous la dépendance de la *thiorédoxine réduite** s'effectue avec transfert sur le thiol de la protéine C. La thiorédoxine oxydée sera réduite à nouveau par la thiorédoxine réductase. Enfin une phosphorolyse termine le cycle, où le phosphate est entraîné

sous forme d'acétyl-phosphate. On voit que l'acide aminé, $H_2N–CH_2–COOH$, a été transformé en $CH_3–COOH$ et NH_3 et il y a bien eu un apport de deux électrons et deux protons. L'acétyl-phosphate sera la source de phosphate pour la synthèse d'une molécule d'ATP.

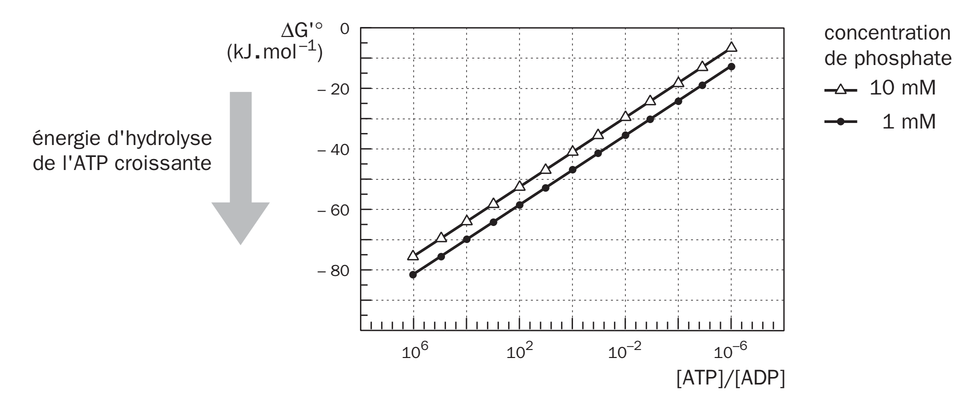
1.3 - ATPASES, ATP SYNTHASES

L'ATP est un donneur de phosphate à haut potentiel et sert de substrat pour les phosphorylations catalysées par les kinases. L'hydrolyse de l'ATP est couplée à d'autres réactions dans de très nombreuses étapes du métabolisme et fait figure d'agent moteur pour maintes synthèses. L'ATP et l'ADP fonctionnent toujours sous formé chélatée par un magnésium dont la présence est sous-entendue. L'hydrolyse est représentée par :

$$ATP^{4-} + H_2O \rightleftharpoons ADP^{3-} + PO_4H^{2-} + H^+ \quad (1)$$

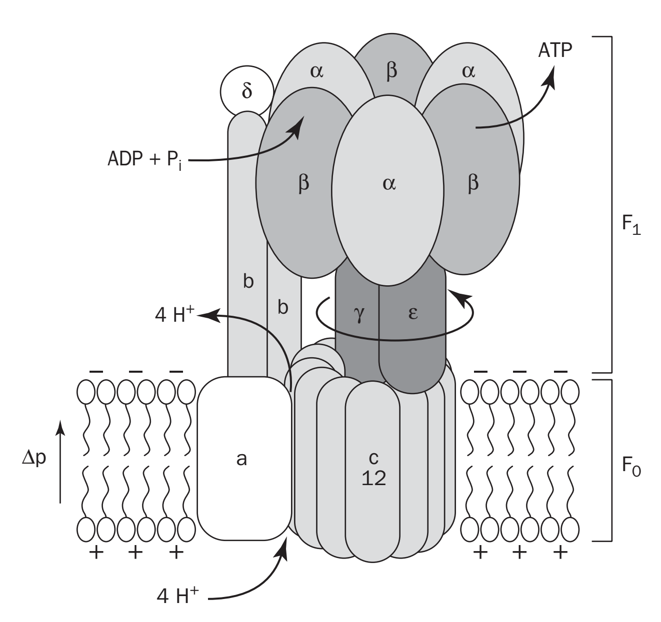
G'° = – 29,4 kJ.mole^{-1} (25°C)

Une hydrolyse en AMP et pyrophosphate libère une énergie comparable, la valeur indiquée étant celle qui correspond à l'état standard. C'est un point de repère qui est très éloigné de la réalité car l'énergie d'hydrolyse de la molécule d'ATP dépend du rapport [ATP]/[ADP] que les cellules s'efforcent de maintenir à un niveau élevé par des mécanismes régulateurs précis. Le graphique montre les variations de l'énergie ATP en fonction de ce rapport. On voit que l'énergie a presque doublé quand le rapport est de 100.



Les *ATPases membranaires** appartiennent à plusieurs catégories désignées par H ou $F_0 F_1$, $A_0 A_1$, P et V. Celles qui nous intéressent ici sont les pompes réversibles de type H qui font communiquer les deux réservoirs d'énergie. Elles synthétisent de l'ATP en faisant entrer des protons dans la cellule. Inversement lorsqu'elles consomment de l'ATP, elles expulsent des protons à l'extérieur et bâtissent un potentiel de membrane. C'est pourquoi on désigne ce type d'enzyme par ATPase/ATP synthase, dont le modèle unique est tiré de la membrane interne mitochondriale ou du colibacille. Ce modèle prévaut, semble-t-il, dans la totalité du monde vivant. L'ATP synthase est toujours un complexe volumineux de plus de 450 kDa.

L'enzyme est composée de deux parties, désignées par F_0 et F_1. La portion basale F_0 est membranaire, de formule $a\,b_2\,c_{12}$, avec un cylindre de sous-unités c disposées en couronne, avec les sous-unités α et β situées latéralement par rapport au cylindre. La tête F_1 est de composition $\alpha_3\,\beta_3\,\gamma\,\delta\,\varepsilon$ et fait saillie dans le cytoplasme des procaryotes, dans la matrice des mitochondries ou dans le stroma des thylakoïdes. Le socle F_0 fonctionne comme un canal pour le passage des protons. La partie F_1 peut être détachée sous forme soluble. C'est la mieux connue sur le plan structural. Les sous-unités α et β se ressemblent par leur structure, mais les 3 sites actifs sont portés essentiellement par les β. Les α lient aussi des nucléotides, et auraient un rôle régulateur.



ATPase/ATP synthase mitochondriale

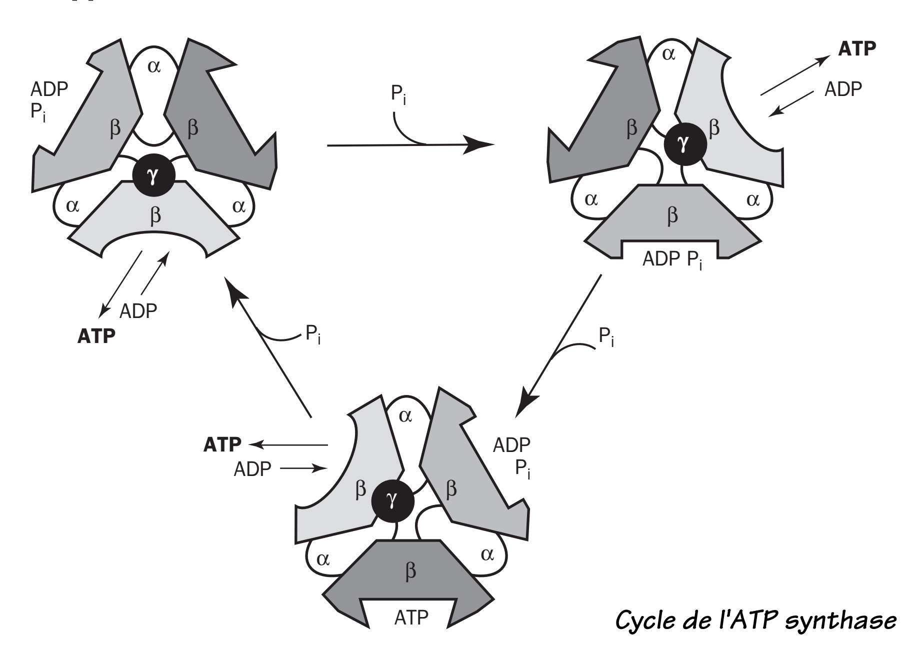
De nombreuses techniques biochimiques et génétiques ont été mises en œuvre pour une cartographie des sites catalytiques. La partie F_1 a été cristallisée et analysée aux rayons X avec des analogues non hydrolysables de l'ATP en place dans les sites de la protéine. L'ATP synthase est une des mécaniques moléculaires les plus extraordinaires que la nature nous ait permis d'entrevoir. La synthèse d'ATP, par ADP + P_i $\rightarrow$ ATP + H_2O, ne peut se faire qu'à contre-courant thermodynamique. Pour que l'équilibre soit déplacé effectivement du côté de la synthèse de l'ATP, il faut que celui-ci soit éliminé au fur et à mesure de sa formation. La solution observée est originale. Les unités β sont animées, en même temps que le reste de l'enzyme, de changements de conformation. Cela signifie que l'affinité de la protéine pour les différents substrats et produits peut varier en fonction de changements structuraux. Une façon d'écarter l'ATP formé des conditions d'équilibre est de former un lien à haute affinité entre lui et l'enzyme :

$$\text{ATP + enzyme} \longrightarrow \text{complexe [enzyme-ATP] à haute affinité.}$$

Cette situation devrait conduire normalement à un blocage, puisque le site enzymatique ne pourrait plus se débarrasser du produit de la réaction. Une action extérieure est donc nécessaire et consistera à faire un nouveau changement de conformation qui aura pour effet de faire tomber l'affinité pour l'ATP et de faciliter sa libération avant un nouveau cycle réactionnel. Ces changements ne sont pas

gratuits, et nécessitent un apport d'énergie qui tire sa source de la force protonmotrice Δp. C'est à la partie F_0 qu'il appartient d'effectuer ce couplage. F_0 fonctionne comme un canal à protons et commande les changements de conformation de la partie F_1. Cette fonction est clairement mise en évidence après l'enlèvement de F_1, qui laisse un vide rendant la membrane perméable aux protons par le canal de F_0. On peut bloquer le passage par des agents découplants comme l'oligomycine et le DCCD, qui forment un lien covalent avec les sous-unités c en un site acide placé à mi-chemin des deux faces de la membrane et conservé dans l'évolution. Une fois détaché de F_0, le bloc F_1 est soluble et ne fonctionne plus que comme une vulgaire ATPase. Une recombinaison de F_0 et F_1 sur la membrane reconstitue l'ATP synthase.

Le fonctionnement de l'ATP synthase est fondé par des variations de conformation subies par les trois sites actifs l'un après l'autre, modifiant leurs affinités pour l'ADP, le phosphate et l'ATP. Ces changements sont commandés par la sous-unité γ qui occupe avec ε le centre de l'anneau et qui explore successivement les trois paires $\alpha\beta$ par un mouvement de rotation autour de l'axe ε. Une pièce tournante ! Cette **rotation** est actionnée par le courant de protons établi au niveau de la pièce de base F_0 et affecte la sous-unité γ, qui confère à l'anneau $\alpha\beta$ de F_1 une structure générale asymétrique. La γ explore successivement les trois sites catalytiques appartenant aux β qui passent tour à tour par au moins trois conformations au cours de la rotation, principe que le schéma symbolise de manière simplifiée, montrant les étapes successives et les rapports avec la sous-unité γ à l'intérieur de l'anneau **[6]**.

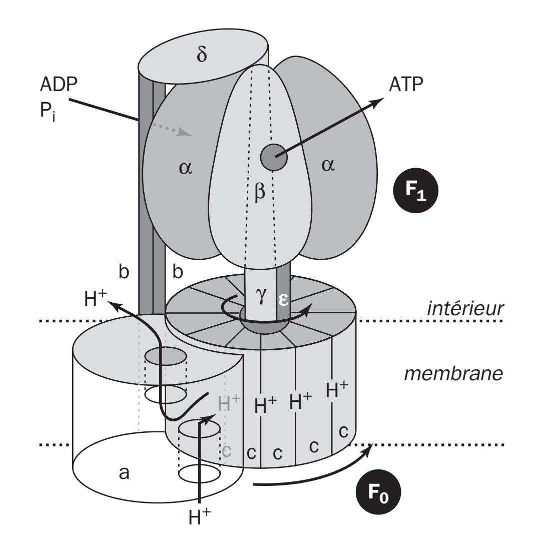


Cycle de l'ATP synthase

La conversion de l'ADP + P_i en ATP provoque une modification du site qui retient l'ATP avec une haute affinité. L'apport énergétique consiste donc à ouvrir le site pour relâcher l'ATP et admettre une nouvelle molécule d'ADP. L'idée avait été émise depuis longtemps par BOYER **[7]**, qui voyait dans certaines conformations

moléculaires un mode essentiel de stockage de l'énergie dans les échanges biologiques[8]. En somme l'ADP arrive, puis le phosphate, l'ATP se fait et sa forte rétention sur le site tire l'équilibre réactionnel en faveur de sa formation. La sous-unité reçoit alors un coup d'épaule qui la force à libérer l'ATP et le cycle recommence. Cette notion n'est devenue plausible que par l'avancée des connaissances sur la dynamique des protéines en général. Il y a un couplage mécanique entre γ et les β successives qu'elle voit défiler au cours de la rotation **[8]**. La rotation subie par la chaîne γ a été vérifiée par des techniques spectaculaires avec le secours de la microscopie de fluorescence, en particulier dans le laboratoire de Masasuke YOSHIDA **[9]**. L'expérience a consisté à immobiliser les particules F_1 sur le verre à l'aide d'un lien histidine par l'extrémité N-terminale des chaînes β[9]. La partie γ avait été soudée à un filament d'actine porteur d'un groupe fluorescent afin de le rendre visible plus facilement. Une caméra vidéo fixée au microscope permettait de voir tourner les filaments d'actine pendant l'hydrolyse de l'ATP ! La direction de rotation n'était pas quelconque, toujours dans le sens inverse des aiguilles d'une montre vu du côté F_0. On peut penser que la rotation s'effectue en sens inverse au cours de la synthèse d'ATP.

La structure très détaillée de la partie F_0 logée dans la membrane reste à déterminer, mais on a une idée assez précise de la topologie des unités c qui forment une couronne solidaire **[10]**. Ce sont des polypeptides assez courts (79 acides aminés) repliés en deux hélices alpha formant épingle à cheveux. Les unités c sont des barreaux organisés en dodécamères et sont orientés à peu près perpendiculairement à la membrane. Leur structure est déduite d'études faites en RMN. Elles subissent un changement de conformation et d'orientation en fonction de leur protonation et déprotonation. Ces changements ont fait l'objet d'une analyse très fouillée par RASTOGI et GIRVIN **[11]**. Ils arrivent à la conclusion que l'ensemble des unités c forme effectivement une pièce tournante entraînant dans son mouvement l'axe $\varepsilon\gamma$ qui pénètre dans F_1.



Le rôle des sous-unités b et δ reste incertain, mais leur présence a été montrée comme indispensable. Il s'agit peut-être d'éléments stabilisateurs (par exemple pour empêcher F_1 d'être entraîné par le mouvement de rotation de l'axe $\gamma\varepsilon$). La

8 - BOYER a reçu tardivement le prix NOBEL en 1997, après que ses idées eussent été confirmées par les travaux sur l'ATP synthase mitochondriale.

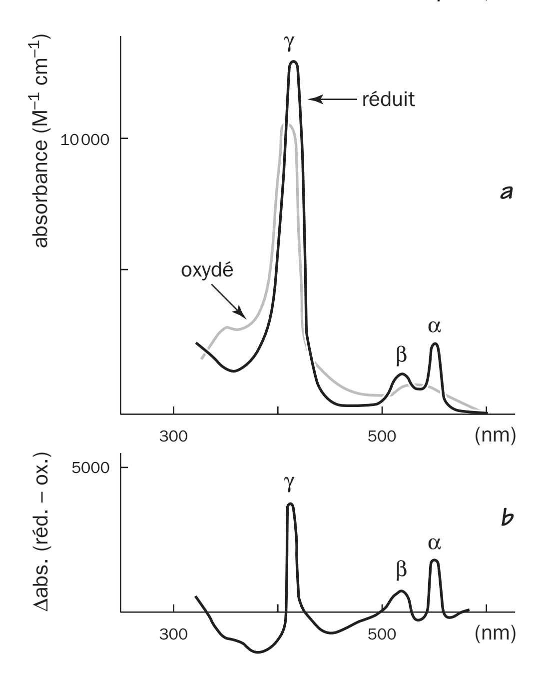
9 - Ces prouesses sont autorisées par la connaissance de la structure de la protéine et par les techniques de modification covalente des protéines de plus en plus perfectionnées.

protéine b est sous la forme d'un dimère. Sa structure est assez exceptionnelle. Chaque sous-unité est une hélice alpha unique très allongée (95 Å), et les deux hélices b sont torsadées en une super-hélice dont la structure a été déterminée à haute résolution **[12]**. Ce système étonnant est, semble-t-il, fortement conservé dans toute l'évolution, et va continuer à susciter un important courant de recherche.

D'autres possibilités sont également débattues. N'oublions pas que l'originalité de se système est de pouvoir fonctionner comme une pompe à protons réversible, caractéristique essentielle, car elle permet aux cellules dépourvues de chaîne respiratoire et tirant toute leur énergie par fermentation de reconstituer un potentiel membranaire à partir de leur ATP. Ce potentiel est vital pour tous les procaryotes et indispensable au fonctionnement des mitochondries et plastes chez les eucaryotes.

1.4 - Cytochromes

Les protéines héminiques appelées cytochromes ont pour activité la plus courante de transférer des électrons d'un donneur vers un accepteur. Ils tirent parti de l'alternance du fer entre les états Fe(II) et Fe(III), et sont des outils cellulaires omniprésents dans maintes biodégradations. Nous en rappelerons quelques propriétés. Leur intervention est pratiquement obligatoire chez les organismes aérobies, mais de nombreuses espèces vivant en absence d'oxygène se servent aussi de cytochromes pour des transformations importantes au sein de l'environnement. Certains cytochromes ont même une activité enzymatique intrinsèque, comme les cytochromes P450. D'autres ont une structure complexe associant divers cofacteurs comme des ions métalliques, des noyaux fer-soufre et des flavines.



L'identification des cytochromes est relativement aisée grâce au spectre différentiel d'absorption, qui tire parti du déplacement spectral par oxydoréduction. La figure *a* montre les spectres du cytochrome c de cheval, petite protéine soluble souvent utilisée pour des tests enzymatiques à l'état oxydé (ox.) et à l'état réduit (red.). En *b*, la courbe mesure la différence d'absorption à toutes les longueurs d'onde du visible entre la préparation réduite par dithionite et la même à l'état oxydé. Cette technique est indispensable dans le cas des cytochromes liés à une membrane, car elle permet d'effacer le bruit de fond causé par la turbidité du milieu. Un raffinement consiste à effectuer ces tracés de spectre à la

température de l'azote liquide (77 K), car les bandes obtenues, plus hautes et plus fines, accordent une meilleure résolution. Une autre spectroscopie utilisée est la RPE qui mesure les variations de *spin** du fer.

La structure moléculaire des porphyrines est une des plus stables de la biosphère, son origine remonte aux origines les plus lointaines de la vie. Les porphyrines se distinguent par la nature des chaînes latérales qui entourent la couronne azotée tétrapyrrolique. Une des plus importantes est la protoporphyrine IX, porteuse de 4 méthyle, 2 propionyle, 2 vinyle. L'insertion du fer donne l'**hème B**, qu'on aperçoit dans le petit formulaire. On sait que l'hème B porteur de Fe(II) est présent dans l'hémoglobine [10]. L'hème O dérive de l'hème B : un groupe vinyle est remplacé par une longue chaîne hydroxyéthyl-farnésyle (rectangle ombré) **[13]**. Une nouvelle transformation catalysée par une oxygénase sur un méthyle engendre l'**hème A**. Ce schéma reste provisoire, vu l'existence de plusieurs variétés d'hème A dans le monde bactérien.

Formules des hèmes B, O et A

L'**hème C** est un hème B attaché à la protéine par deux liens covalents établis par les chaînes latérales vinyle et le soufre de la cystéine. L'attachement se fait sur un fragment de séquence conservé Cys-x-x-Cys-His (ou Lys), l'histidine formant la sixième coordinence sur le fer. La cinquième coordinence de l'autre côté est le plus souvent l'histidine (la méthionine dans le cytochrome c mitochondrial). Les *cytochromes c** sont typiquement des transporteurs d'électrons extra-cytoplasmiques, logés dans le périplasme des Gram-négatifs ou accolés à la face externe de la membrane cytoplasmique, mais des espèces comme le colibacille en sont dépourvues. On distingue les cytochromes c en classes I, II et III. Certains contiennent 2, 6, 8 hèmes C et davantage, formant des chaînes de transfert intramoléculaires. À l'examen d'une séquence, la présence de deux cystéines espacés de deux autres résidus et voisin d'un histidine ou d'un résidu basique est un indice sérieux de la présence d'un hème C.

---

10 - Lorsque le fer s'oxyde le Fe (III), l'hème est transformé en hémine. Pour des raisons de simplicité, on a coutume d'appeler hème la porphyrine contenant du fer sans préciser son degré d'oxydation, qui alterne entre + 2 et + 3 dans les cytochromes.

Cytochrome c

L'**hème D** est un cas particulier rencontré dans une oxydase terminale de *E. coli* et diverses espèces bactériennes. Il remplace l'hème O ou un hème A dans certaines oxydases en fonction des conditions physiologiques. Il est généralement facile à détecter grâce à sa bande alpha exceptionnellement déportée vers le rouge (630 nm).

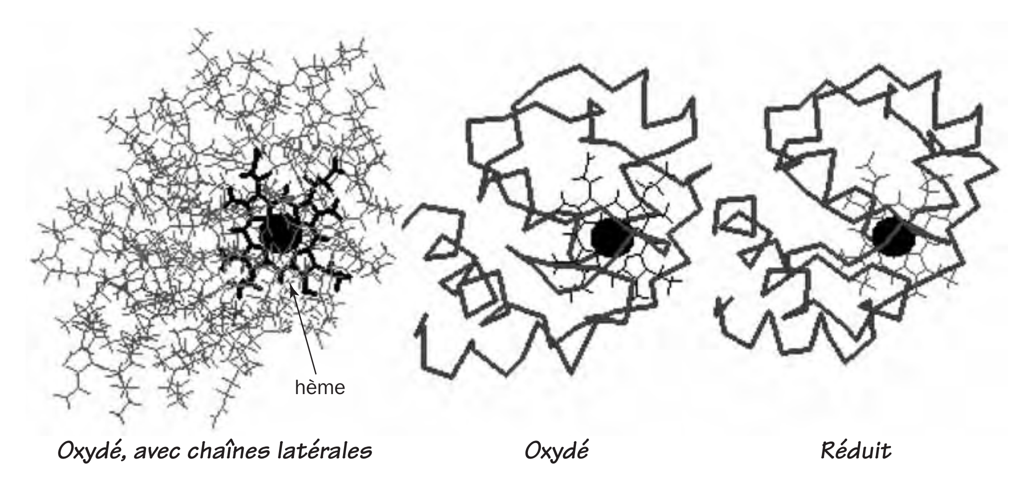
Un tableau simplifié indique plusieurs catégories de cytochromes en fonction du type d'hème qu'ils hébergent. Les cytochromes qui réagissent avec des substrats tels que O_2, NO, NO_2^- sont facilement inhibés par CO, l'ion cyanure ou azoture ("azide"), qui prennent la place du substrat normal. Dans d'autres cas (cytochromes b ou c), l'inhibiteur peut s'installer en déplaçant une des liaisons de coordinence. Les potentiels d'oxydoréduction ne sont donnés qu'à titre indicatif.

Cyt.	α (nm)	*Type d'Hème*	*E°' (mV)*	*Observations*	*Inhibiteurs*
a	585 - 605	Hème A	vers 300 - 350	lipophile	CO, CN^-, N_3^-
b	555 - 565	Hème B	– 50 à + 100		
c	545 - 554	Hème B	+ 200 à 250	lien covalent	réaction lente avec CN^-
d	630	Hème D	vers 300 - 350	bactérien	CO, CN^-, N_3^-
o	554 - 565	Hème O	> + 250	bactérien	CO, CN^-, N_3^-

Le cytochrome c mitochondrial est une des premières protéines analysées en détail. Sa faible masse moléculaire en faisait un modèle idéal. En outre elle présente un conservatisme remarquable au cours de l'évolution, la séquence et la structure ayant gardé de fortes ressemblances des bactéries à la levure de bière et à l'homme. Autrement dit l'étude d'un cytochrome de mammifère donne une idée assez précise du fonctionnement des cytochromes en général chez les micro-organismes. La réduction du fer dans le cytochrome c s'accompagne d'un changement structural de la molécule. Il y a des mouvements de certaines chaînes latérales et une légère réorientation de la charpente polypeptidique à certains endroits, au point que la protéine réduite ne cristallise plus dans le même système géométrique que la protéine oxydée, comme l'ont montré TAKANO et DICKERSON **[14]** La structure du cytochrome c de cheval est illustrée ici à l'état oxydé et à l'état réduit [11].

---

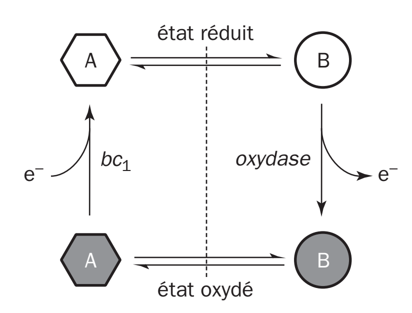
11 - Les structures ont été établies manuellement ici comme ailleurs dans ce livre, avec les coordonnées complètes téléchargées de la Brookhaven Data Base, et en utilisant le programme RasMac (Rasmol pour Mac) 2.7.1 écrit par R. SAYLE.



Cytochrome c de cheval

Les modifications de conformation du cytochrome c au cours des oxydoréductions ouvrent une fenêtre sur le mécanisme des transferts d'électrons dans les protéines de ce type. La porphyrine et la chaîne polypeptidique assurent des échanges radicalaires d'un électron entre le fer et la surface. Le changement conformationnel aurait une fonction fondamentale. Le transfert d'un électron entre le donneur (complexe bc_1) et l'accepteur (cytochrome c oxydase) entraîne le cytochrome c dans un cycle décrit par un dessin. L'oxydoréduction correspond au déplacement vertical, le changement structural dans le sens horizontal.

La protéine qui s'oxyde n'est donc plus tout à fait la même que celle qui restitue un électron à l'oxydase, un peu comme s'il y avait alternance entre deux couples redox différents. Le cycle est ici parcouru dans le sens des aiguilles d'une montre, il ressemble à un cycle d'hystérésis accompagné d'un échange d'énergie, celui qui est requis par la modification de conformation.
Ce principe équivaut pour les chimistes à un nivellement de l'énergie d'activation de la réduction de l'oxydase par le donneur.



L'idée est de voir le cytochrome comme une sorte d'enzyme catalysant l'échange d'électrons et utilisant les mêmes règles de mouvements conformationnels que les protéines en général. On retrouve cette propriété dans l'azurine de *Pseudomonas aeruginosa* qui est une petite protéine contenant du cuivre servant de transporteur couplé à un cytochrome c_{551}. La structure détaillée de l'azurine est connue et bascule entre deux conformations alternées au cours de l'échange d'un électron et d'un proton avec le cytochrome **[15]**.

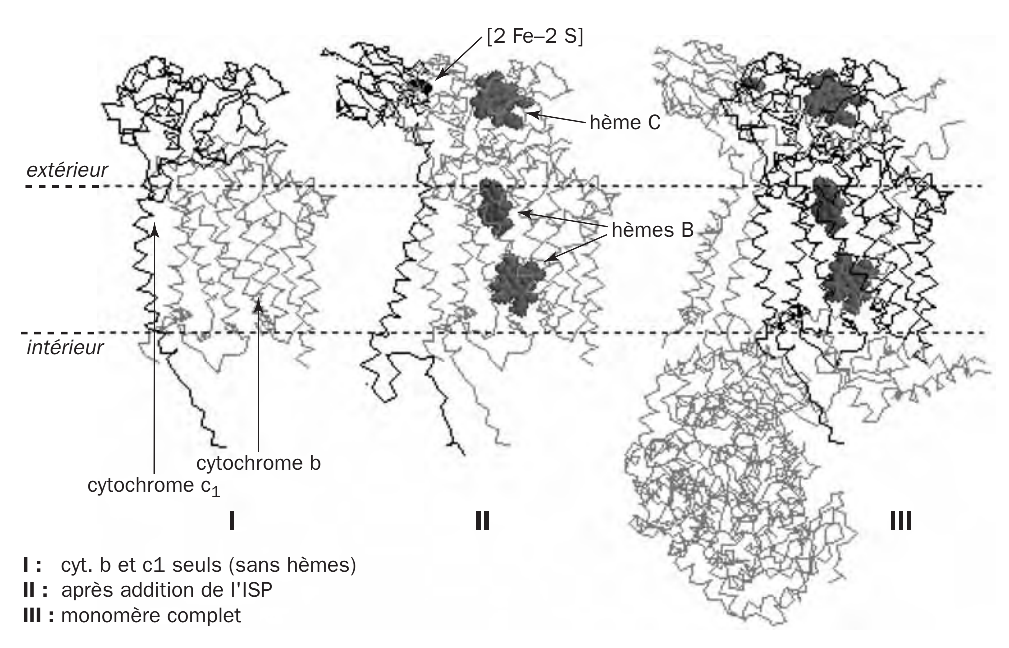
Les cytochromes c fonctionnent invariablement à l'extérieur du cytoplasme chez les procaryotes. Ils sont libres dans le périplasme des bactéries Gram-négatives, ou attachés à la face externe de la membrane cytoplasmique. De même ils sont logés du côté lumen dans les thylakoïdes des cyanobactéries et des chloroplastes. Les mitochondries animales et végétales portent leurs cytochromes c dans le compartiment intermembranaire. Il semble donc que pour devenir fonctionnel un cytochrome c doive franchir obligatoirement les limites du cytoplasme où il est synthétisé. Il y a un principe général qui veut que l'apocytochrome c (la protéine sans sa porphyrine) soit transporté à destination avant de recevoir son groupe héminique. Comme celui-ci est synthétisé dans le cytoplasme, il faut donc qu'il traverse la membrane avant d'être soudé à la protéine par des résidus de cystéine. La dernière étape de la synthèse de l'hème est l'insertion du fer dans la porphyrine à l'aide d'une ferrochélatase, donnant l'hème B, et c'est à l'état réduit que l'hème sera inséré dans un cytochrome c et soudé pour devenir un hème C. La fabrication des cytochromes c montre différents niveaux de complexité dans la nature et demande au moins 9 facteurs dans les protéobactéries α et γ, les archaebactéries et les mitochondries des plantes. Le processus est plus simple dans les mitochondries animales, ou encore chez les champignons qui ont un mécanisme particulier **[16]**. La complexité est intermédiaire dans les chloroplastes, les bactéries Gram-positives et les cyanobactéries. La fonction des différents facteurs et leur évolution gardent encore beaucoup de points d'ombre **[17]**.

1.5 - COMPLEXES DE TYPE BC_1

Les cytochrome bc_1 canalisent les électrons des ubiquinones vers le cytochrome c dans les chaînes respiratoires qui en possèdent. C'est le complexe III dans les mitochondries. L'oxydoréduction correspondante s'accompagne d'une translocation de protons d'un côté de la membrane, et offre un exemple emblématique de la conservation de l'énergie sous forme de potentiel électrochimique membranaire couplé aux oxydations. La constitution d'un complexe bc_1 semble universelle par sa composition. On y rencontre un **cytochrome b** intégré à la membrane et contenant deux hèmes B proches l'un de l'autre , un **cytochrome c_1** dont la plus grande partie se trouve à l'extérieur et une **protéine fer-soufre** ou **ISP** ("*iron-sulfur protein*"), à noyau [2Fe-2S] d'un type spécial dit *de RIESKE**. Le complexe mitochondrial bovin a été obtenu cristallisé et porte d'autres polypeptides extérieurs à la membrane qui sont absents dans les bactéries **[18]**. Le complexe semble fonctionner partout sous forme de dimère. Le dessin ne représente que la charpente des polypeptides à l'exclusion des chaînes latérales d'acides aminés. Les trois sous-unités sont figurées ensemble en II, soit le cytochrome b, la partie fer-soufre (l'ISP, avec [2Fe-2S]) et la partie c_1 ont respectivement 42, 22 et 27 kDa. Les autres chaînes représentent environ 154 kDa au total dans le complexe bovin (ajoutées en III).

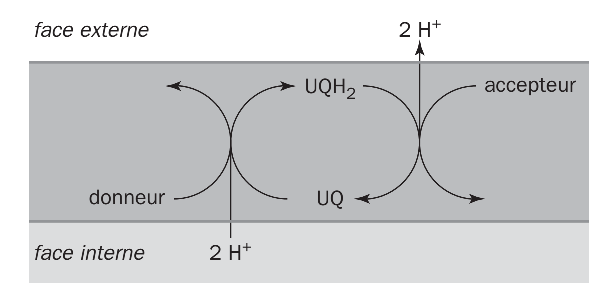
Les bc_1 sont donc les intermédiaires obligés entre les quinones respiratoires (ubiquinones) et le cytochrome c. La réduction d'une quinone en quinol, puis sa réoxydation par un cytochrome bc_1 donne lieu par elle-même à une conservation

d'énergie. On l'explique aisément par la disposition asymétrique du donneur et de l'accepteur dans la membrane, soit d'un côté une déshydrogénase et de l'autre le complexe bc_1 ou tout autre accepteur.



Monomère bc_1 mitochondrial

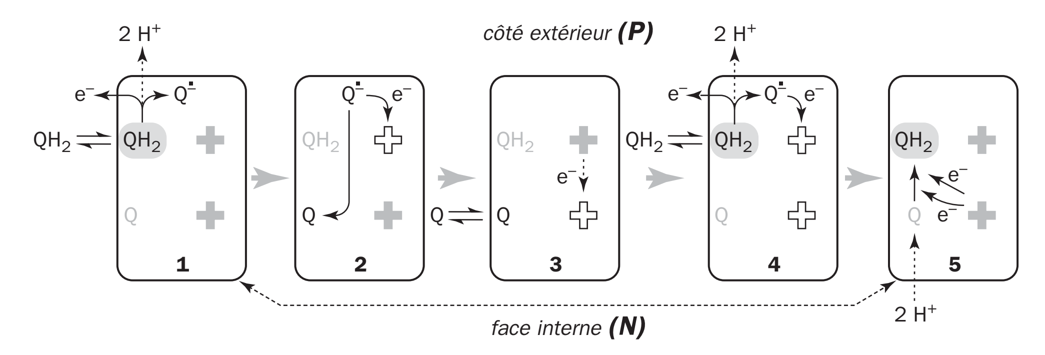
La réduction complète de la quinone consomme deux protons, la réoxydation les restitue. Si par suite de cette asymétrie, la réduction a lieu près de la face interne de la membrane et sa réoxydation du côté externe, le **cycle des quinones** produira à chaque tour un flux net vers l'extérieur de deux protons pour deux électrons, en faveur d'un potentiel de membrane (une Δp).



Le cycle réactionnel du complexe bc_1 permet d'augmenter ce bilan. L'oxydation de l'ubiquinol se fait en deux étapes avec passage par le stade semiquinone, et envoi chaque fois d'un électron vers les deux hèmes B, puis au noyau fer-soufre de l'ISP (la protéine de RIESKE), et enfin à l'hème C de la sous-unité c_1. À la fois l'ISP et la sous-unité c_1 sont ancrées à la membrane par des hélices alpha, mais leurs parties

essentielles débordent largement vers l'extérieur [12]. Le cytochrome c_1 occupe donc la sortie. Il entre en contact avec l'accepteur final du complexe qui est un cytochrome c à faible masse moléculaire. Chose intéressante, l'ISP porte son noyau fer-soufre dans une tête portée par un axe flexible, et l'on pense qu'elle peut basculer alternativement du cytochrome b vers la partie c_1. Les deux hèmes B sont désignés habituellement dans la littérature par b_L et b_H (L et H pour low et high potential). Ils sont orientés l'un au-dessus de l'autre à peu près perpendiculairement au plan de la membrane et se distinguent par leurs propriétés [13]. Le premier est un b_{566} à bas potentiel (-30 mV), l'autre (b_H) est un b_{560} à potentiel plus élevé (+90 mV). Le fonctionnement du complexe est inhibé par deux séries d'agents qui se lient à des endroits différents : l'**antimycine** et le HQNO d'une part, le **myxothiazol,** la stigmatelline et le MOA-stilbène de l'autre. En outre la partie cytochrome b a deux sites où peuvent s'installer les quinones/quinols, l'un étant près de l'extérieur (côté **P** ou côté positivement chargé), l'autre de la face interne (côté **N** ou négatif)...

Le fonctionnement du complexe bc_1 est encore controversé. Le cycle réactionnel appelé **cycle Q**, proposé par MITCHELL **[19]** est certainement révisable mais ses grandes lignes font la base des discussions. Au départ est une molécule de QH_2 sur le complexe. Le modèle est fondé sur deux oxydations successives en 1 et 2 transformant QH_2 en semiquinone puis en quinone.



Cycle Q (interprétation simplifiée

La première oxydation réduit l'ISP, la deuxième l'un des hèmes B. Deux protons sont expulsés. En 3, un hème B transmet un électron à l'autre, dans un ordre qui est controversé. Une quinone échangeable avec la membrane est présente.

En 3 et 4, le processus se répète et deux protons sont éjectés à nouveau. Deux molécules de QH_2 ont été oxydées et deux électrons stockés sur le tandem des hèmes B. En 5, ces deux électrons sont réutilisés pour réduire une des deux

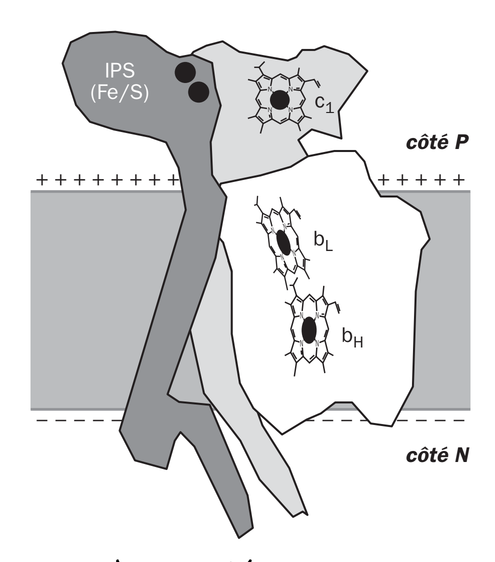
12 - Donc dans le périplasme pour les bactéries Gram-négatives, dans l'espace intermembranaire pour les mitochondries.

13 - Rappel : deux structures chimiques identiques, ici les hèmes B, peuvent avoir des propriétés physiques et réactionnelles différentes en fonction de leur environnement moléculaire au sein de la protéine, et différentes de celles qu'elles auraient en solution.

molécules de quinone en quinol QH_2, l'autre étant échangée avec la membrane. Tout se passe donc comme si l'une des deux molécules de QH_2 traitées était régénérée sous sa forme initiale. Au point de vue bilan, une molécule de quinol a été oxydée avec envoi de 2 électrons un par un sur l'ISP, 2 protons ont été prélevés dans le cytoplasme et 4 protons ont été éjectés. Le cycle Q est défendu notamment par TRUMPOWER et associés **[20]**. Pour d'autres chercheurs, en particulier HATEFI, une révision du cycle Q comme modèle s'impose néanmoins **[21]**. Une propriété capitale du bc_1 est de pouvoir fonctionner de façon réversible. Dans le sens de l'oxydation d'un quinol par le cytochrome c, il génère un gradient de protons. Inversement, par le retour de protons du côté extérieur vers l'intérieur, il engendre un courant d'électrons en sens inverse vers la réduction des quinones. Il y a donc utilisation de la Δp pour renvoyer les électrons vers des valeurs plus négatives du potentiel, une disposition particulièrement importante dans le métabolisme des autotrophes.

Le cycle Q a été passé au crible des études cinétiques utilisant des inhibiteurs. L'antimycine et le myxothiazole avaient été supposés initialement se comporter comme des analogues des quinones et quinols. La première s'installerait du côté N et l'autre du côté P, ceci en considérant l'existence des deux sites de fixation (QH_2 et Q) comme explicité antérieurement.

Le site quinonique placé du côté P (extérieur, près de ISP) permettant la fixation QH_2 n'a pas été localisé sur les structures déterminées par cristallographie, et son existence est contestée. En outre la cinétique du courant d'électrons inverse, en partant de ISP et c_1 préalablement réduits, indique un transfert d'électrons de b_L vers b_H. Le transfert des électrons à partir de l'ubiquinol aurait donc lieu de b_H vers b_L, en sens contraire de celui qui était prévu par le modèle du cycle Q. La tendance est de considérer que les inhibiteurs ne prennent pas la place des quinones, mais contribuent à verrouiller la structure en empêchant les mouvements nécessaires à l'accomplissement du cycle.



Modèle simplifié du complexe bc_1

Les changements conformationnels au cours du cycle sont devenus évidents grâce aux indications convergentes de la cristallographie, de l'analyse génétique, des mesures spectrales et cinétiques **[22]**. L'un d'eux paraît admis par tous les auteurs. La sous-unité ISP avec son noyau fer-soufre possède à l'extérieur de la membrane une tête portée par une tige flexible, qui l'amène tantôt dans le voisinage de b_L, tantôt vers le cytochrome c_1. On peut comprendre l'importance de ce mouvement de la façon suivante. Quand deux électrons arrivent en provenance du quinol membranaire (QH_2), la partie flexible ISP s'écarte en direction du cytochrome c_1 dès

qu'elle a reçu un premier électron. Le mouvement empêche le deuxième électron de suivre le même chemin et permet son envoi vers la paire des hèmes (b_H/b_L). Celle-ci peut stocker deux électrons en tout, soit un sur chaque hème. En somme quand le quinol cède ses électrons, l'un va d'un côté (sur ISP), le second de l'autre côté sur la paire b_H/b_L. Cet aiguillage est essentiel pour que le cycle effectue un deuxième tour, augmentant le nombre de protons relâchés vers l'extérieur, soit quatre en tout au lieu de deux. Des mouvements plus compliqués du complexe sont envisagés, en particulier dans l'association au sein du dimère.

Divers spécialistes considèrent les cytochromes complexes bc_1 comme les représentants d'un dispositif moléculaire ancestral de valeur universelle, appartenant à une chaîne respiratoire primitive, dont le plan se retrouve chez les eubactéries et les archaebactéries : une courroie de transmission génératrice d'énergie électrochimique entre quinones réduites et oxydase terminale.

1.6 - OXYDASES RESPIRATOIRES TERMINALES

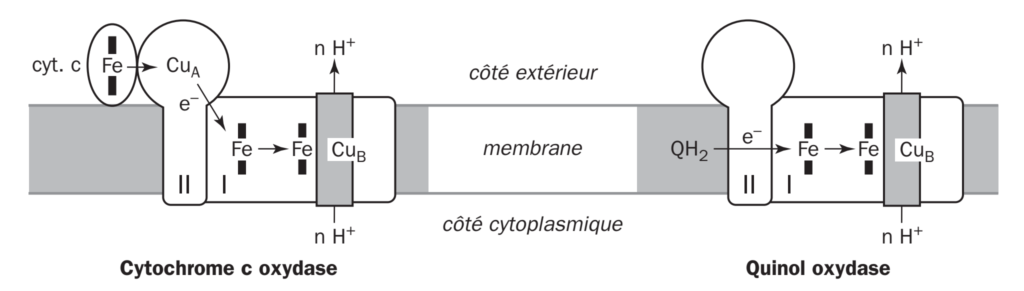
Les oxydases terminales reçoivent les électrons d'une chaîne de transporteurs respiratoire, et catalysent la réaction : $O_2 + 4\ e^- + 4\ H^+ \rightarrow 2\ H_2O$. L'oxygène parvient par la face cytoplasmique de la membrane bactérienne. Le donneur direct est un cytochrome c ou une quinone respiratoire réduite ou quinol. Ces enzymes se répartissent donc en cytochrome c oxydases et quinol oxydases. En outre la plupart des oxydases respiratoire effectuent une **translocation de protons** couplée à la réduction d'O_2 et autorise une conservation d'énergie sous forme de potentiel membranaire. La cytochrome c oxydase ou cytochrome aa_3 des mitochondries animales ou de levure appartient à la membrane interne et ne renferme pas moins de 13 sous-unités différentes, numérotées par ordre de mobilité croissante à l'électrophorèse. Les bactéries n'ont en général que les trois premières (I, II et III), qui sont les sous-unités fondamentales trouvées chez tous les êtres vivants. Les parties I et II sont essentielles au transfert des électrons, tandis que la III est surtout stabilisatrice au niveau de la membrane. Celles des mitochondries sont codées par l'ADN des particules que l'on sait avoir dérivé de lointains procaryotes.

Les cytochromes c oxydases de *Paracoccus denitrificans* et *Rhodobacter sphaeroides* ont servi de bons modèles d'étude. Elles sont associées à une chaîne respiratoire dont le plan est grosso modo calqué sur celui de la mitochondrie, où l'ubiquinone réduite est réoxydée par l'intermédiaire d'une chaîne de cytochromes bc_1 et c. Les quinol oxydases sont au bout d'une chaîne plus simple et ne sont pas toujours conservatrices d'énergie par translocation de protons. Leur fonction peut consister à éponger rapidement l'excès d'O_2 dans les conditions de pléthore d'énergie ou lorsque l'oxygène en excès se montre toxique pour la cellule [14].

---

14 - L'activité des chaînes respiratoires est souvent très facile à doser sur des suspensions de fragments de membrane par oxydation du NADH (test de la "NADH oxydase"). On peut, soit examiner la disparition du NADH à 340 nm, soit utiliser un test colorimétrique à base de DCIP et PMS, ou encore un sel de tetrazolium.

Les oxydoréductions internes de l'oxydase respiratoire se font selon un dispositif commun moyennant quelques variantes. Dans les cas typiques, il existe 4 noyaux métalliques : deux renferment du cuivre et sont désignés par $\mathbf{Cu_A}$ et $\mathbf{Cu_B}$, les deux autres sont **héminiques**. Donc deux 2 Cu et 2 Fe. Le noyau Cu_A peut être bi-métallique, avec deux atomes de Cu, ou être absent. Le contenu est alors de 5 atomes métalliques ou seulement de 3, et non pas quatre. La variété des situations est importante à ce niveau et le dessin ne servira que de repère. La partie gauche symbolise les sous-unités I et II dans un cytochrome $\mathbf{aa_3}$ dans la mitochondrie de la levure de bière, de *Paracoccus denitrificans* et de *Rhodobacter sphaeroides*. La partie droite représente le $\mathbf{ba_3}$ d'*Acetobacter aceti*, l'$\mathbf{aa_3}$ de *Bacillus subtilis* et le **bo** de *E. coli*. Les hèmes sont symbolisés par des traits noirs comme vus par la tranche, orientés perpendiculairement au plan de la membrane.



Les deux types d'oxydases terminales

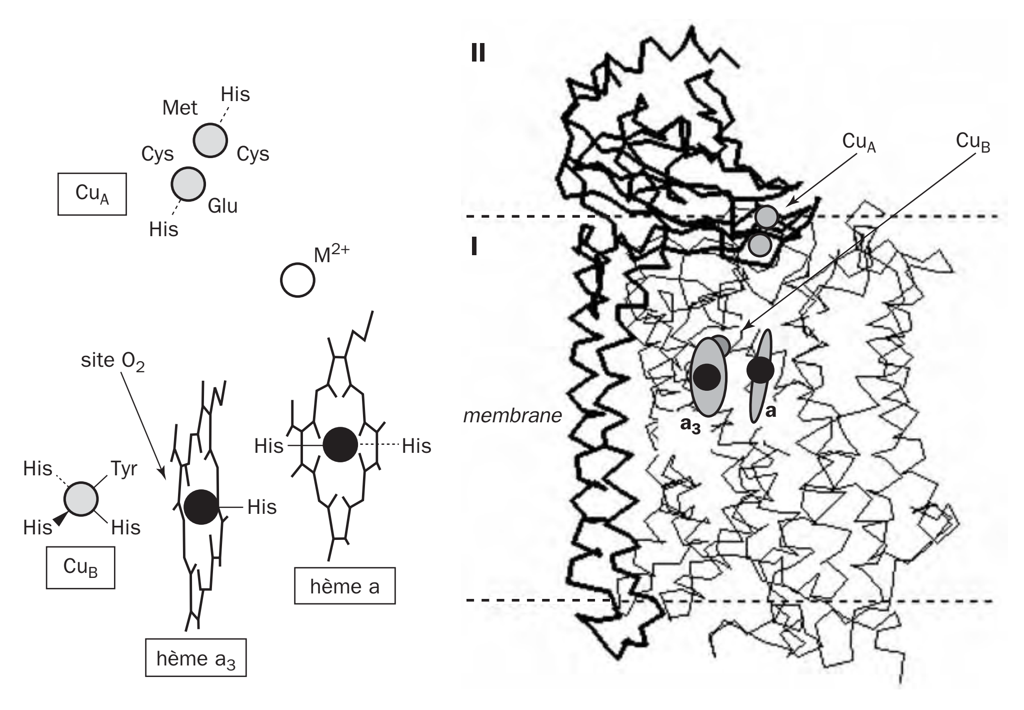
Les sigles tels aa_3 et bo, font référence à la nature des deux hèmes de la sous-unité I. C'est là que se font la réduction de l'oxygène et la translocation de protons. Ces hèmes sont de type A, O, B ou D selon les cas. Comme on pouvait s'y attendre, la structure des unités I et II ancrées à la membrane a été fortement conservée dans l'évolution. Déterminer la structure du complexe qu'elles forment ne fut pas chose facile, car il s'agit de protéines membranaires très insolubles difficiles à cristalliser autrement qu'en présence de détergent et de facteurs étrangers comme des anticorps. La structure des oxydases aa_3 dans les mitochondries bovines et *Paracoccus denitrificans* est maintenant connue en détail et constitue un pas important pour comprendre le mécanisme de ces étonnantes machineries moléculaires **[23]**. Les électrons arrivent du côté périplasmique et sont livrés un à un par le cytochrome c sur la partie II qui dépasse hors de la membrane. Deux électrons sont provisoirement emmagasinés au niveau de Cu_A grâce au deux ions cuivre qui sont réduits en Cu(I). Le cheminement se fait par l'hème **A** hexacoordonné dans la partie II, puis vers l'hème $\mathbf{A_3}$ penta-coordonné [15]. Le fer de celui-ci est à 4,5 Å de Cu_B. Il forme avec celui-ci une paire métallique diamagnétique (pas de signal en

On mesure alors essentiellement la NDH. Le test est stimulé par le cyanure, qui supprime la compétition avec le reste de la chaîne respiratoire en aval et oblige tous les électrons à aller vers les colorants. Chez les bactéries détentrices d'un bc_1, on peut mettre en évidence l'oxydation de l'ascorbate ou du TMPD par la partie aval de la chaîne.

15 - *Hexa-coordonné : 6 liaisons dont 4 dans le plan de la porphyrine, et deux perpendiculaires de chaque côté. Penta-coordonné : la sixième position est libre et peut s'établir avec un ligand étranger.*

RPE) et constitue la zone essentielle où s'effectue la réduction de l'oxygène. On a découvert un site supplémentaire recevant un métal divalent (M^{2+}), comme le calcium, le magnésium ou le manganèse, dont la fonction reste inconnue.

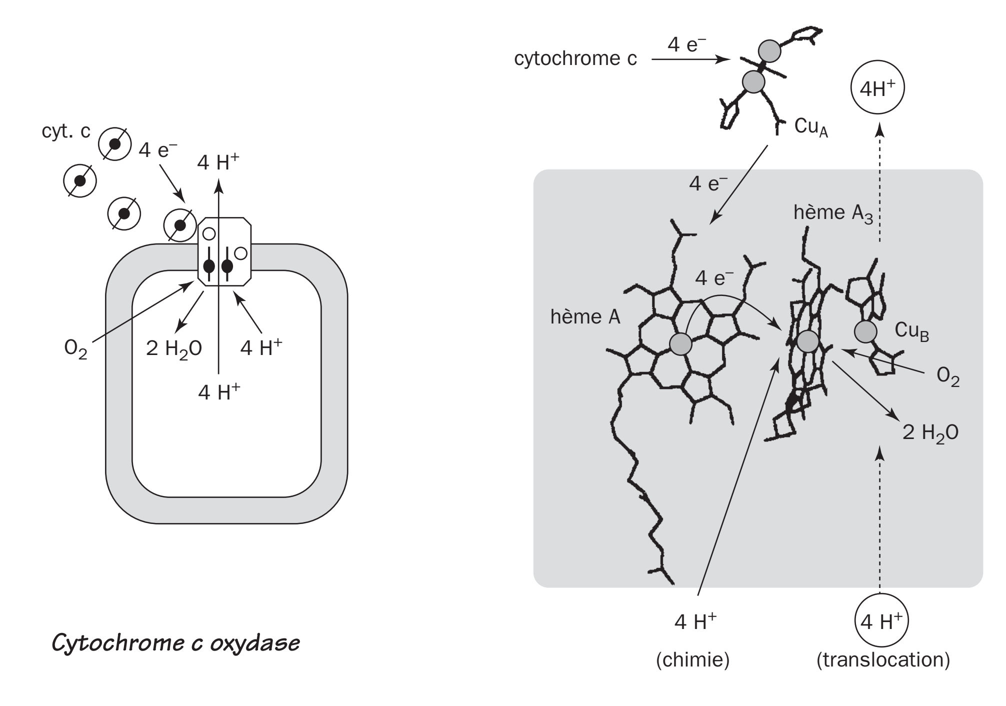
Les pièces I et II de la cytochrome oxydase traversent la membrane par une forêt d'hélices alpha hydrophobes au sein desquelles s'effectue le passage des protons. Il faut 4 protons prélevés du côté interne pour former après réduction d'O_2 les deux molécules d'eau. Un nombre de protons supplémentaires estimé à 4 sont exportés de l'intérieur vers l'extérieur, pendant que 8 électrons sont reçus et réduisent O_2 en 2 H_2O. Le flux total est donc de 8 protons prélevés à l'intérieur et 4 émis à l'extérieur, la différence de charges ainsi créée étant à la base de la conservation de l'énergie liée à l'oxydoréduction.



Parties I et II de l'oxydase de Parococcus denitrificans

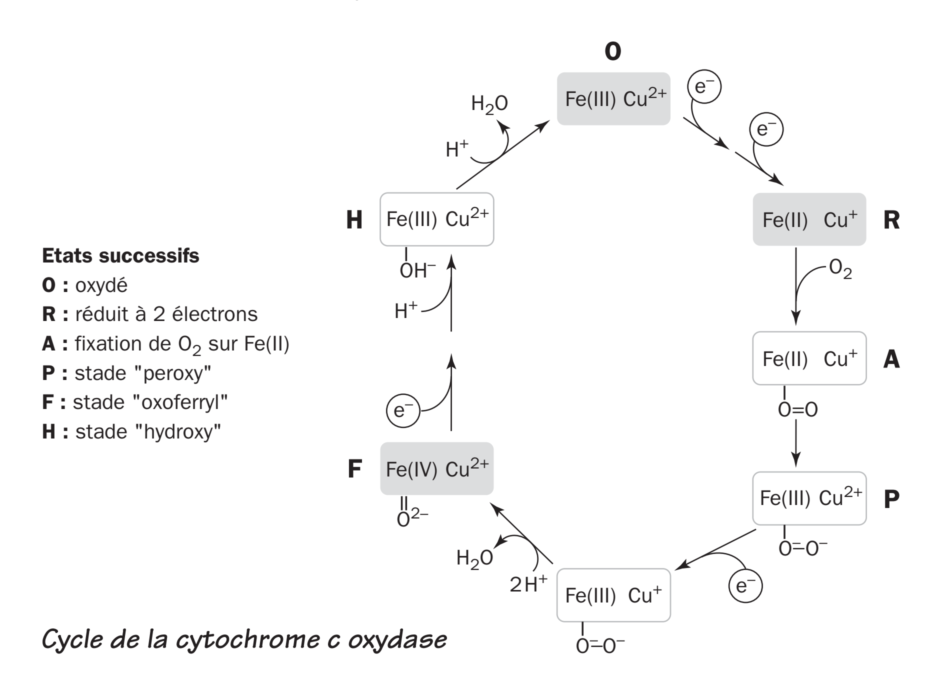
Un travail expérimental important a été effectué depuis la découverte de cette translocation de protons par WIKSTRÖM **[24]** et a conduit à déterminer la voie de passage probable des protons à travers le système, la translocation étant actionnée à l'évidence par des changements alternés de conformation de tout l'édifice à chaque cycle réactionnel.

Les quinol oxydases fonctionneraient sur le même principe. L'oxydase bo de *E. coli* a une sous-unité II homologue de celle de *Paracoccus* sur le plan structural, mais n'a pas de cuivre. Les éléments réducteurs sont acheminés par une ubiquinone (UQ_8) qui oscille entre état oxydé et réduit en passant par un stade radicalaire (semiquinone), les électrons étant transmis un par un.



Cytochrome c oxydase

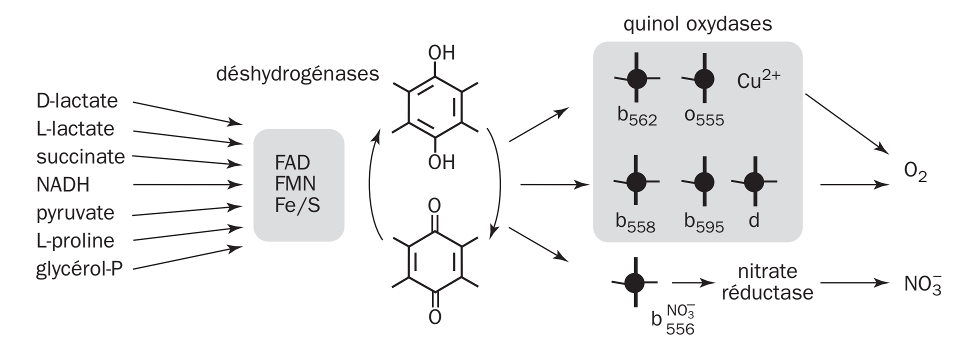
Le cycle catalytique de l a cytochrome oxydase **[25]** est indiqué ici de façon simplifiée. Les symboles O, R... H ont été maintenus pour faire le lien avec la littérature scientifique. Dans les rectangles, le tandem Fe-Cu symbolise le couple bi-métallique formé par l'hème a_3 et le Cu_B dans le site actif.



Cycle de la cytochrome c oxydase

Une des principales difficultés est l'identification des étapes de changement de conformation que l'on croît être responsables de la translocation des protons. On voit que le tandem Fe/Cu est d'abord pleinement réduit à l'état R, et que l'oxygène se fixe ensuite sur l'hème A_3 au niveau du fer [16]. Au stade P, l'oxygène diatomique est réduit au niveau peroxyde. Après l'arrivée d'un troisième électron, la liaison entre atomes d'oxygène est rompue. L'opération est une sorte de dismutation : il y a d'un côté une réduction à deux électrons qui donne une molécule d'eau, le groupe restant est oxydé en donnant le stade F. Un quatrième électron réduit celui-ci en H, et l'hydroxyle est éliminé sous forme de la deuxième molécule d'eau. Nous avons donc 4 électrons arrivant dans le cycle en ordre dispersé, production de 2 molécules d'eau avec entrée de 4 protons, qui sont prélevés du côté interne. Les 4 protons supplémentaires soumis à translocation ne sont pas inscrits sur le diagramme.

À quels stades la translocation a-t-elle lieu ? En se fondant sur les données spectroscopiques, il a été prouvé que des changements de conformation ont lieu au cours du cycle, chaque transition étant couplée à une éjection de protons dans un seul sens **[26]**. Un seul serait émis lors de la réduction de O vers R, deux au cours de la transition de P à F, et un dernier de F à O. Pendant que fonctionne cette subtile mécanique, chaque molécule d'O_2 atteint le noyau Fe/Cu par un chenal qu'on croît avoir identifié dans la structure, tandis que les molécules d'eau s'échappent à l'opposé par un autre chenal. Néanmoins la nature des changements de conformation pendant le cycle est controversée et l'existence de changements structuraux d'ensemble a été contestée. KANNT et coll. ont présenté un modèle élaboré qui ne fait appel qu'aux changements d'ionisation de plusieurs groupes **[27]**. Tout ceci est un schéma moyen qui ne s'applique pas exactement aux quinol oxydases. Le **cytochrome bd** de *E. coli* est une ubiquinol oxydase spéciale ne contenant que deux sous-unités et trois noyaux métalliques comprenant les hèmes b558, b595 et D. Son fonctionnement est radicalaire (électron par électron) comme celui du cytochrome bo **[28]**. L'architecture de la protéine est différente, sa lignée évolutive est distincte, et sa résistance à des inhibiteurs comme le cyanure ou l'azoture est plus marquée.



Chaînes respiratoires de E. coli

16 - *Rappel : l'oxygène diatomique est lié dans les porphyrines par le fer ferreux, comme dans l'hémoglobine.*

Un caractère saillant des chaînes respiratoires bactériennes aérobies est leur multiplicité dans une même cellule. Différentes voies sont utilisées en parallèle ou en alternance en fonction des conditions. Le poste d'aiguillage est au niveau des quinones respiratoires logées dans la membrane et constituant à l'état réduit un réservoir d'électrons jouant le rôle de tampon entre les substrats oxydés en amont et les accepteurs en aval. Le colibacille offre le cas le plus simple. Les électrons sont prélevés par les déshydrogénases sur des substrats variés et canalisés sur l'ubiquinone. La forme quinol (ou semiquinone, non figurée) est réoxydée en aérobiose vers une quinol oxydase, sans passer par un cytochrome c.

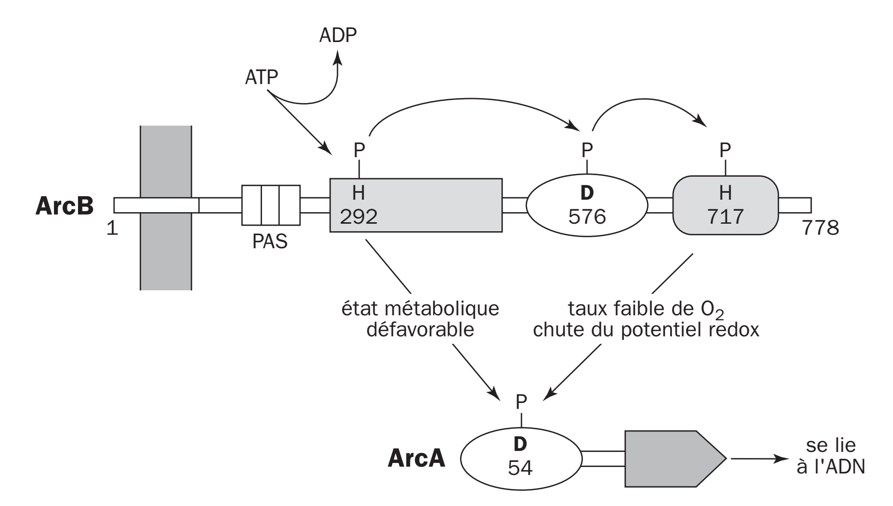
Les bactéries renferment plusieurs déshydrogénases membranaires réagissant avec les quinones, comme celles du lactate, du succinate et autres. La plus importante est la NADH déshydrogénase, ou NDH. Ce système est particulièrement complexe et ne contient pas moins de 14 sous-unités, si on en juge par le nombre des gènes et de polypeptides identifiables. Les cofacteurs sont FMN, non lié de façon covalente, et au moins 8 noyaux fer-soufre de type [2Fe-2S] et [4Fe-4S]. Le passage des électrons s'accompagne d'une translocation de protons, une situation qu'on retrouve dans la NDH mitochondriale, appelée site I, et qui est encore plus complexe puisqu'elle n'a pas moins de 42 sous-unités! Du côté opposé de la chaîne, l'aiguillage des quinones favorise la **quinol oxydase bo** en milieu fortement aéré dans une population soumise à des divisions rapides. La voie de la **quinol oxydase bd** (cytochrome bd) prend la relève en oxygène limitant ou en culture surpeuplée. Ce cytochrome possède une affinité très élevée pour l'oxygène par rapport au cytochrome o [17]. En outre la voie de l'oxydase bd n'est inhibée par le cyanure qu'à des doses 100 fois plus fortes (de l'ordre de 0,5 mM). L'emploi en parallèle de ces deux systèmes aérobies est régulé avec précision au sein de la bactérie. La surpopulation et la baisse de l'oxygène disponible induisent la synthèse du cytochrome bd et répriment celle du cytochrome bo.

Le système régulateur à deux composants **ArcB/ArcA** participe au contrôle. Comment ? Chez *E. coli*, ArcB fait deux choses, détecter la chute du potentiel d'oxydoréduction dans la cellule lorsque O_2 devient limitant, et se phosphoryler elle-même en ArcB-P à l'aide d'ATP. La protéine est ancrée dans la membrane et dépasse vers l'extérieur. Sa séquence de 778 acides aminés chez *E. coli* est symbolisée sur le schéma comme une succession de domaines [18]. Une petite structure répétée notée *PAS** est courante dans ce genre de récepteur. La phosphorylation se fait sur un premier site noté H (pour histidine) à la position 292. Le phosphate est transmis sur un second site noté D (pour aspartate) en 576, ou directement sur la protéine ArcA. Le phosphate peut aussi gagner l'autre bout de la séquence, en un site H à la position 717. Celui-ci peut aussi phosphoryler ArcA. En somme ArcA devient **ArcA**-P à la position D en 54, par deux voies différentes. ArcA-P se lie par un domaine terminal à l'ADN et fonctionne comme régulateur de transcription **[29]**.

---

17 - Son coefficient Km pour l'oxygène est 0,38 µM, contre 2,9 µM dans le cas du cytochrome o.

18 - La structure de la protéine est constituée de plusieurs modules articulés entre eux et repliés chacun de façon plus ou moins autonome (comme s'il y avait un chapelet de plusieurs protéines différentes plus petites).



Le système ArcB/ArcA du colibacille

ArcB est une sorte de capteur qui transmet son signal en agissant comme kinase sur lui-même, puis sur ArcA. En somme, ArcB sert de détecteur et répercute les signaux sur ArcA comme activateur de transcription. La zone PAS aurait un rôle dans la détection du manque d'oxygène, mais il n'y a aucune certitude sur le mécanisme. Une fois phosphorylé, ArcB-P active une collection d'opérons impliqués dans la physiologie de l'anaérobiose :

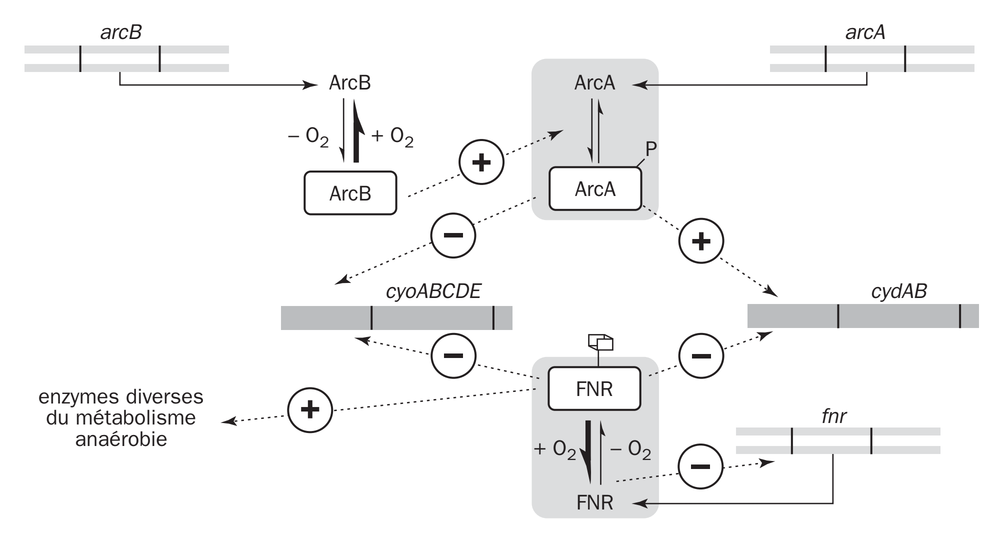
- synthèse de déshydrogénases flaviniques ;
- induction d'enzymes de la bêta-oxydation des acides gras ;
- modification de la carte enzymatique du cycle de KREBS et de la voie appelée "shunt glyoxylique" ;
- inhibition de l'amorçage de la réplication de l'ADN ;
- remplacement du cytochrome terminal bo par le cytochrome bd.

Tous les gènes concernés correspondent à un *régulon**. Parmi les opérons ainsi régulés sont *cyoABCDE* et *cydAB* qui codent respectivement pour les quinol oxydases bo et bd, comme indiqué un peu plus loin.

Une régulation supplémentaire détecte à la fois la disparition d'O_2 et la présence du nitrate. Elle est sous la dépendance de protéines régulatrices telles que **FNR**[19] et **Nar,** que nous retrouverons en examinant la dénitrification, celle-ci étant une respiration de remplacement quand l'oxygène fait défaut. De façon générale, les protéines régulatrices telles que ArcB-P ou FNR interviennent sur la transcription des gènes en se liant sur l'ADN au voisinage immédiat ou à petite distance des gènes concernés. La figure montre qu'une diminution de l'oxygène favorise le recours à l'oxydase bd codée par *cydAB* et met en veilleuse l'autre oxydase. L'anaérobiose inhibe la synthèse des deux oxydases devenues inutiles. L'activateur FNR entre alors en lice et induit la nitrate réductase nécessaire à la respiration sur nitrate. Nous verrons que FNR est un régulateur majeur du passage à l'anaérobiose. Le dessin résume le principe de ce double contrôle. La baisse du taux d'O_2 favorise

19 - FNR = "fumarate-nitrate-reduction".

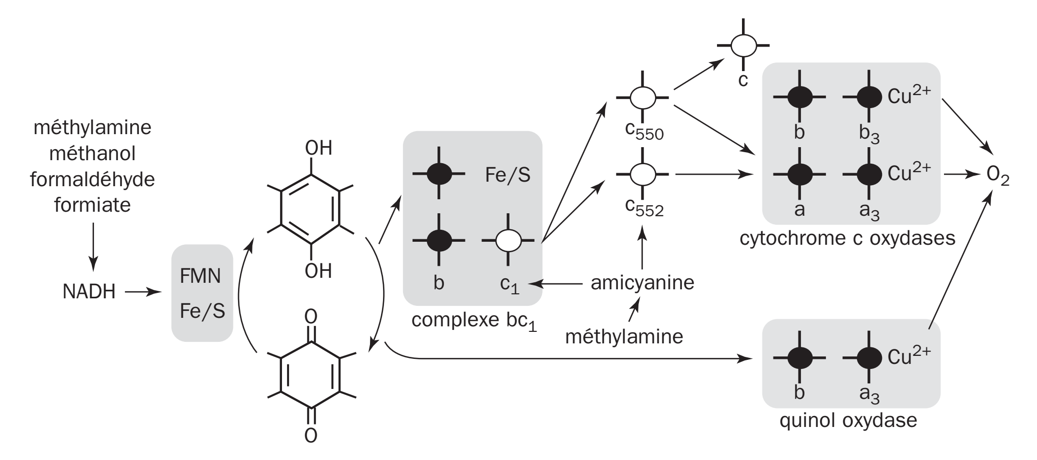
la phosphorylation de ArcA, active la sortie de l'une des oxydases et refoule la synthèse de l'autre.



ArcA/ArcB, FNR

En absence d'oxygène, FNR active la production de diverses enzymes du métabolisme anaérobie, réprime ici la sortie des deux oxydases devenues inutiles. En outre FNR réprime en permanence sa propre synthèse, ce qui fait que cette protéine régulatrice reste à taux faible dans la cellule. Nous retrouverons FNR à propos de la dénitrification. Cette protéine agit à la fois comme capteur dans la détection d'O_2, et comme régulateur de transcription.

Nous finirons par un deuxième modèle qui sera celui de *Paracoccus denitrificans*. Il atteint un niveau de sophistication élevé, car ces bactéries sont adaptables à toutes sortes de conditions quand elles oscillent entre l'aérobiose et l'anaérobiose.



Paracoccus denitrificans en aérobiose

Elles sont capables de réduire des nitrates et autres oxydes d'azote (nitrites, NO, N_2O), oxyder l'hydrogène moléculaire et se développer sur des substrats monocarbonés (méthanol, méthylamine). Cette espèce est donc méthylotrophe. Le dessin montre la chaîne de transfert des électrons allant de gauche à droite à partir de divers donneurs, transmis par NADH, le complexe NADH déshydrogénase (marqué FMN-Fe/S), les quinones, le complexe bc_1, des cytochromes c, des oxydases terminales.

L'originalité est ici la présence simultanée en aérobiose de cytochrome c oxydases et de quinol oxydases. Deux portes de sortie sur le dioxygène. Les pièces supplémentaires par rapport aux transferts d'électrons du colibacillle sont le complexe bc_1 et plusieurs cytochromes c. Toutes ces relations fonctionnelles ont été déterminées par la sélection de mutants **[30]**. Comme dans le colibacille, une oxydase à affinité plus faible pour O_2 est la principale utilisée quand l'oxygénation est forte (aa_3), tandis que la cbb_3 est davantage synthétisée dans les conditions inverses. Un aiguillage important est le cytochrome c_{552}. La quinol oxydase ba_3 correspond à la bo de *E. coli*. Pourquoi une troisième oxydase ? Une hypothèse est de la considérer comme une valve régulatrice, qui permet de désengorger la réserve des quinones réduites lorsque les oxydations sont trop intenses en amont **[31]**. Une autre particularité est la synthèse en présence d'une **méthylamine déshydrogénase** qui produit du formaldéhyde et de l'ammoniac. Est induite également une petite protéine contenant du cuivre, l'**amicyanine**, qui réduit les différents cytochromes c.

La dichotomie des chaînes respiratoires se rencontre chez les *Pseudomonas* et espèces reliées, qui se caractérisent par une gamme immense de potentialités dans les biodégradations de substrats très nombreux. La plupart des espèces qui privilégient la vie aérobie sont munies d'une voie contenant un complexe bc_1, un cytochrome c et une cytochrome oxydase. Une chaîne de cette sorte, qui rappelle celle de la mitochondrie, est typiquement inhibée par l'**antimycine A**. En outre elle est facilement repérée par un test microbiologique courant, qui consiste à vérifier l'oxydation du TMPD, avec apparition d'une zone colorée en bleu violet autour des colonies sur boîte gélosée. Cette réaction caractérise les espèces "oxydase-positives" et dénote la présence d'un cytochrome c.

En conclusion, nous constatons un formidable pouvoir d'adaptation aux conditions de vie aérobies et une multiplicité de solutions aux problèmes posés. La principale fonction est la récupération d'énergie mais ce n'est pas la seule. Les oxydases terminales ont aussi pour rôle d'éponger l'oxygène excédentaire afin d'en éviter les effets toxiques.

1.7- PHOTOTROPHIE NON-OXYGÉNIQUE

Le principe de la photosynthèse est connu de tous les biologistes. Il est généralement décrit en détail dans le cas des végétaux verts pour des raisons évidentes. La photosynthèse des procaryotes a des caractères particuliers mais garde la même finalité. L'énergie lumineuse captée par des pigments fait apparaître des

entités assez réductrices pour l'assimilation du dioxyde de carbone. Néanmoins les modalités de la photosynthèse des plantes et des algues ne sont pas extrapolables telles quelles aux procaryotes. Deux cas de figure bien nets sont observés chez ces derniers. Le premier est une photosynthèse non oxygénique parce que l'eau n'est pas un donneur d'électrons. Elle fonctionne essentiellement en anaérobiose. Le second est la photosynthèse oxygénique pratiquée par les cyanobactéries. Le principe est en gros celui qu'utilisent les plantes mais avec des modalités originales. On le laissera de côté provisoirement.

Les bactéries phototrophes sont souvent strictement anaérobies, mais certaines espèces montrent une plus grande tolérance à O_2 et acceptent parfois l'aérobiose complète. La plupart peuvent utiliser comme source d'électrons l'hydrogène et diverses entités minérales comme le soufre et les sulfures, ou encore des composés organiques. L'assimilation du gaz carbonique permet au plus grand nombre de vivre en autotrophie. Ce sont donc des photo-autotrophes. Le pouvoir réducteur né de l'énergie lumineuse ne sert pas qu'à réduire le dioxyde de carbone, mais peut se voir diriger vers la réduction de certains composés organiques. Les bactéries photosynthétiques forment un ensemble hétérogène aux potentialités complexes et variées dans les eaux douces ou marines. On les trouve en abondance dans les mares et les étangs, les mangroves, dans les milieux non brassés mais exposés à la lumière. Le tableau offre quelques points de repère.

Grand groupe	*Propriétés*	*Types*
I - Pourpres sulfureuses	Anaérobies strictes, autotrophes par cycle de CALVIN, utilisent H_2, le soufre, les sulfures. Accumulent des granules de soufre intra-cellulaires. Flagellées	*Chromatium*, *Thiospirillum*, *Thiocapsa* (δ-protéobactéries)
II - Pourpres non sulfureuses	Anaérobies mais supportant parfois une certaine aérobiose, autotrophes par cycle de CALVIN, utilisent H_2, des composés organiques. Hétérotrophie possible à la lumière ou avec O_2 à l'obscurité. Flagellées. Sensibles aux sulfures.	*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* (α-protéobactéries)
III - Vertes sulfureuses	Anaérobies strictes, autotrophes par cycle spécial des acides tricarboxyliques, utilisent H_2, le soufre, les sulfures. Chlorosomes. Croissance possible en lumière très faible.	*Chlorobium*, *Pelodictyon*
IV - Vertes non sulfureuses	Anaérobies ou aérobies photo-hétérotrophes, utilisent des sulfures et composés organiques, mobiles par glissement dans les sources chaudes, ont des chlorosomes.	*Chloroflexus*
V - Héliobactéries	Anérobies strictes proches des Gram-positives, photo-hétérotrophes, vivent dans le sol desséché et non sulfureux des rizières **[32]**	*Heliobacterium*, *Heliobacillus*, *Heliochlorum*

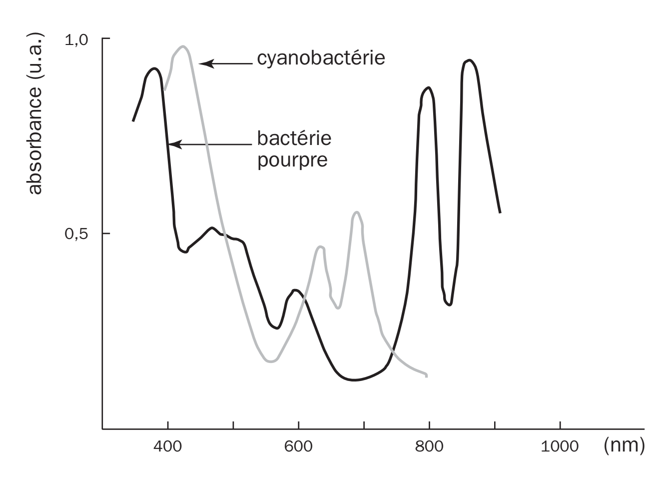
Ces différentes catégories sont généralement bien décrites dans les manuels de microbiologie, mais il a fallu ajouter récemment un nouveau groupe rassemblant des espèces très hétérogènes. On y relève un nombre important d'α-protéobactéries marines qui prennent une part notable, peut-être de 5%, à la photosynthèse

du picoplancton des océans **[33]**. Ce sont donc des **aérobies** plus hétérotrophes qu'autotrophes. Aucune n'utilise l'eau comme donneur d'électrons et aucune ne libère de l'oxygène. Elles utilisent des composés soufrés et surtout des composés organiques. La découverte étonnante de ces organismes sans liens taxonomiques les uns avec les autres a été facilitée par des techniques fluorimétriques perfectionnées autorisant l'identification précise des pigments chlorophylliens. Toutes ces bactéries sont surtout des photo-hétérotrophes qui se servent d'O_2 pour oxyder des matières organiques. D'autre part la présence d'oxygène serait nécessaire à la synthèse de la chlorophylle. Il y a donc une sorte de paradoxe. Quel est le rôle de la lumière? Il est probable que le bas potentiel généré est utilisé pour réduire des molécules organiques en composés qui seront oxydés ensuite par l'oxygène. En somme il s'agirait de tirer une meilleure énergie des oxydations en partant de substrats rendus à un potentiel plus bas qu'au départ. Les bactéries de cette catégorie ont souvent moins de pigments chlorophylliens et davantage de ***caroténoïdes**** que les bactéries phototrophes anaérobies, sans doute parce que leur métabolisme ne dépend pas uniquement de la lumière. On les considère provisoirement comme capables de jouer simultanément sur les deux tableaux au cours de l'éclairement diurne, par un métabolisme mixte à la fois autotrophe et hétérotrophe **[34]**. Il est devenu clair que ces espèces participent avec les cyanobactéries à l'économie carbonée des océans. Leur découverte tend à remettre en cause les modèles climatiques et la prise en compte du cycle du carbone. Leur intervention dans les biodégradations reste cependant à déterminer.

Nous revenons maintenant aux phototrophes les plus classiques, à savoir les bactéries pourpres et vertes des lignes I à III. Elles utilisent comme pigment récepteur des **bactériochlorophylles** (BChl) très proches des pigments utilisés par les plantes et contenant comme eux du magnésium comme métal. La plus commune est la bactériochlorophylle *a*, qui dérive de la chlorophylle *a* des végétaux par des modifications mineures. D'autres pigments, BChl *b*, *c* et *d* sont des variantes. Une longue chaîne latérale hydrophobe est faite par estérification avec un alcool insaturé. Les pigments chlorophylliens sont généralement accompagnés de caroténoïdes. Ces pigments participent à la collecte de la lumière, mais n'y sont pas essentiels, car des mutants bactériens sans caroténoïdes continuent à faire une photosynthèse malgré une plus grande fragilité aux conditions externes. Les caroténoïdes sont des anti-oxydants contre les radicaux libres ou l'oxygène singulet et participent à une défense contre O_2. La nature des pigments et leurs relations avec les protéines déterminent les caractéristiques spectrales des récepteurs. Ainsi les chlorophylles *a* et *b* des plantes absorbent dans le bleu au-dessous de 450 nm et dans le rouge, respectivement à 680 et 675 nm, tandis que les bactériochlorophylles vont plus loin dans le rouge et le proche infrarouge : 805 et 850-910 pour la BChl *a*, et 840, 1020-1035 pour la Bchl *b*. Les caroténoïdes contribuent à combler partiellement les trous du spectre par leur absorbance dans la zone des 450-510 nm. Les propriétés spectrales ont d'importantes répercussions sur le plan écologique. En effet les bactéries pourpres et vertes, spécialisées dans une photosynthèse anaérobie, se placent en milieu aquatique à l'écart de la surface, sous les zones habituellement colonisées par les végétaux verts, les algues et les cyanobactéries. Leurs caractéristiques spectrales les aident à capter

des tranches du spectre qui n'ont pas été arrêtées par d'autres. Les bactéries sulfureuses vertes adoptent une autre stratégie. Leurs chlorophylles spécialisées absorbent dans la zone 715-760 nm, où la compétition est sévère, mais compensent par une extraordinaire adaptation à un éclairement très faible. En eau calme s'établit une stratification thermique entre les eaux de surface, les mieux éclairées et les plus chaudes, et les eaux profondes, plus froides, enrichies par les émanations sulfureuses des sédiments et pauvres en oxygène.

Les bactéries pourpres se tiennent au-dessous de la zone de transition appelée thermocline. Leur répartition s'établit en fonction de la lumière, du taux d'O_2, de celui du sulfure et des matières organiques. Les zones les plus sombres, totalement anaérobies et riches en sulfure sont favorables aux sulfureuses vertes du genre *Chlorobium*. Cyanobactéries, algues et végétaux comme les lentilles d'eau (*Lemna*) s'établissent au-dessus de la thermocline.



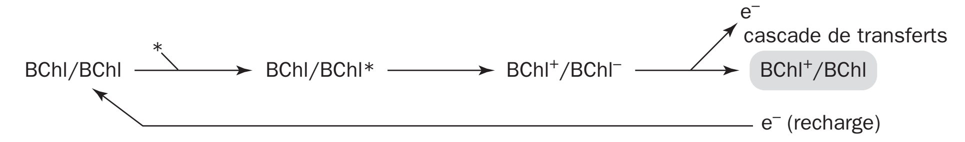
Une telle répartition dans les milieux aquatiques est rarement stable. Les perturbations sont de nature saisonnière ou météorologique, le brassage des couches provoque une redistribution des germes et des constituants dissous, avec des remontées de matériaux venant du fond. Ce phénomène très important, appelé "*upwelling*", redistribue les matières organiques déposées sur le fond. Il s'effectue à grande échelle dans les milieux marins.

Le terme de photosynthèse recouvre évidemment deux phases. La première est la collecte de la lumière et sa transformation en énergie chimique. La seconde est le métabolisme d'assimilation de CO_2 en molécules organiques et relève de la biochimie classique [20]. Nous ne retiendrons ici que la première pour ses caractères particuliers. La conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique sous forme d'un bas potentiel d'oxydoréduction se fait dans des complexes membranaires dits **centres réactionnels**. Ces derniers sont entourés par une nappe de pigments associés à des protéines et constituant l'antenne. L'ensemble formé par un centre réactionnel et son antenne est désigné comme photosystème (PS) et les bactéries non oxygéniques n'en renferment que d'une seule catégorie. Grâce aux pigments antennaires, une plus grande surface réceptrice est obtenue pour capter la lumière. Celle-ci engendre des *excitons** qui convergent à grande vitesse de pigment à pigment jusqu'au centre réactionnel dans un laps de temps de l'ordre de la

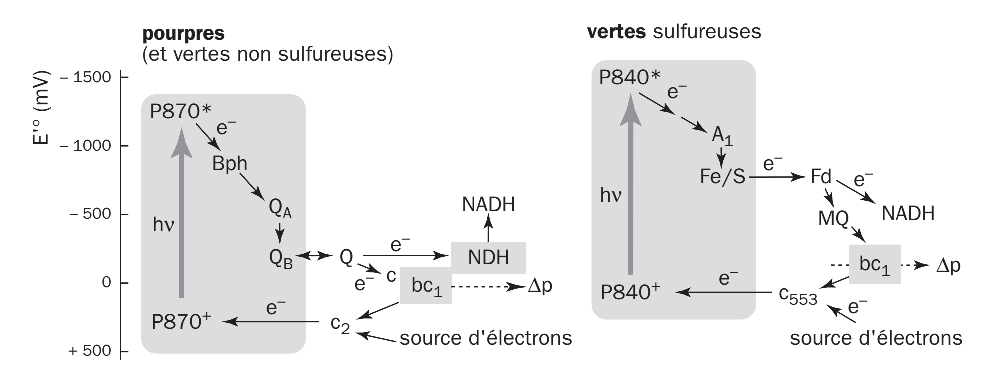
---

20 - Le cycle de CALVIN est résumé en glossaire, à l'exclusion du cycle réducteur des acides tricarboxyliques.

picoseconde. L'ensemble de ces transferts n'est réalisé que par une architecture moléculaire très stricte des complexes antennaires et du centre réactionnel. Celui-ci est chargé de matérialiser un exciton sous forme d'un électron à potentiel très réducteur. La conversion se fait alors au niveau d'une paire de molécules de bactériochlorophylle (BChl/BChl). Le mécanisme fondamental est celui de la séparation de charges. L'arrivée d'un exciton (astérisque) se traduit par la séparation des charges positive et négative dans la paire de Bchl. Un électron est évacuée dans une chaîne de transferts qui est d'abord interne au centre réactionnel laissant un trou (la charge positive) qui sera comblé par retour d'une charge venant de l'extérieur.



Le trou formé dans la paire de Bchl par le départ d'un électron se traduit par un affaiblissement du signal spectral dans la partie rouge lointain du spectre. Par exemple ce phénomène s'observe à 870 nm chez *Rhodobacter sphaeroides*, et le centre réactionnel est désigné comme P870, tandis qu'un *Chlorobium* a un P840 et une plante verte un P700. La figure symbolise chaque centre réactionnel par un rectangle grisé. Les potentiels réducteurs sont vers le haut. Les dimères de Bchl ayant reçu un exciton (*P870, P840)** sont portés à un très bas potentiel et amorcent un courant d'électrons partiellement cyclique faisant retour aux dimères chargés positivement et portés à un potentiel oxydant ($P870^+$, $P840^+$).

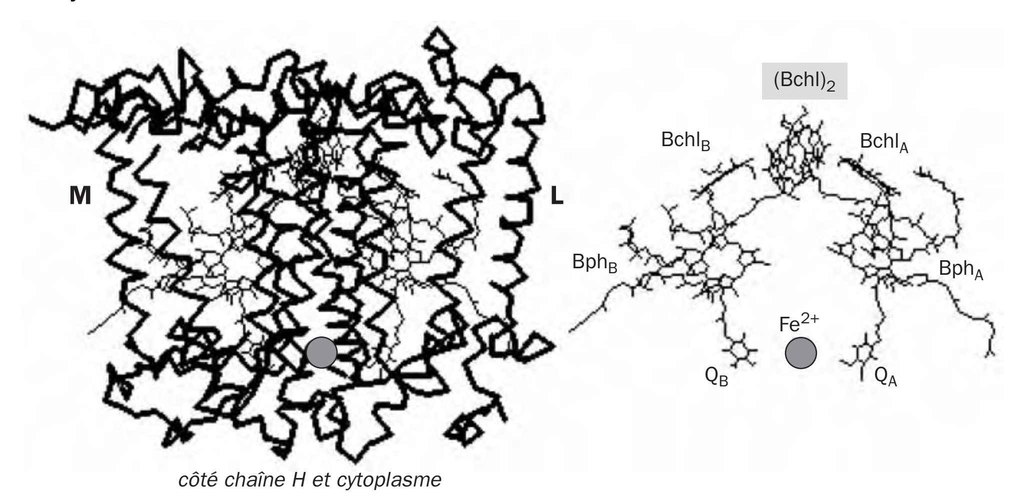


Bph - bactériophéophytine **QA, QB, Q, MQ** - quinones transporteurs d'électrons
bc_1 - complexe cytochrome bc_1 **A1, Fe/S** - noyaux fer-soufre **Fd** - ferrédoxine
NDH - NADH déshydrogénase fonctionnant en courant d'électrons inverse

L'énergie lumineuse apportée par un exciton fait jaillir le P870 et le P840 à un niveau d'énergie supérieur qui amorce un courant électronique visible dans les deux cas sur la figure, un peu comme fonctionnerait une photopile. Les électrons ont deux destinations. La première est de faire retour au niveau de base par un circuit fermé qui passe par un cytochrome complexe bc_1 de même nature que celui qui a été décrit. Cette étape est capitale, car elle est translocatrice de protons et charge

le potentiel membranaire signalé par Δp. L'énergie ainsi récupérée conduira à une synthèse d'ATP. La deuxième voie des électrons sert à réduire le NAD^+ en NADH par la déshydrogénase notée NDH. Dans le cas des bactéries pourpres, la sortie des électrons se fait par quinones interposées (Q) à un potentiel moins négatif que celui du NADH. En conséquence un courant d'électrons inverse est nécessaire, actionné par l'énergie de la force protonmotrice Δp. Dans le cas des bactéries vertes comme *Chlorobium limicola*, à droite sur la figure, ce retour n'est pas nécessaire car les électrons sortent du centre réactionnel par une ferrédoxine réduite à un potentiel suffisamment négatif (Fd). Il est évident que la synthèse de NADH dans les deux cas détourne une part des électrons du circuit. La source d'électrons extérieure est là pour combler le déficit. Il s'agit de l'hydrogène, des composés soufrés, et dans le cas des bactéries pourpres de substances organiques. L'ensemble du dispositif met donc en jeu des molécules de pigments (BChl, Bph), des quinones, des complexes protéiques (bc_1, NDH), divers cytochromes c qui n'ont pas tous été indiqués. Les bactéries vertes fonctionnent à un potentiel plus négatif que les pourpres, utilisent une ferrédoxine et font appel de préférence à une ménaquinone (MQ).

Le centre réactionnel des bactéries pourpres non sulfureuses, *Rhodobacter sphaeroides* et *Rhodospirillum rubrum*, est le mieux connu après les études cinétiques, la détermination de la structure **[35]** et l'usage de mutants. C'est une petite merveille moléculaire. Chaque centre contient deux polypeptides fondamentaux, L et M (ou A et B) de structure similaire. Ils sont associés au dimère de BChl, et à plusieurs pigments, des bactériophéophytines (Bph_A, Bph_B) et bactériochlorophyles ($BChl_A$ et $BChl_B$). Ils comportent aussi un ion Fe^{2+} et deux sites de fixation pour quinone (Q_A, Q_B). La présence de peptides supplémentaires du côté cytoplasmique, comme H, n'est pas générale. Chez la plupart des espèces sauf *Rhodobacter capsulatus*, le centre réactionnel est étroitement associé du côté périplasmique à un cytochrome c.



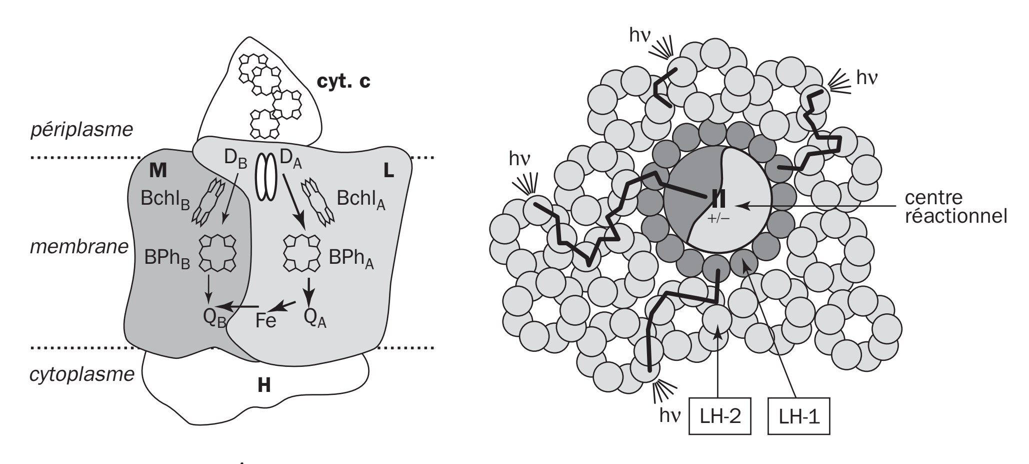
Centre réactionnel de Rhodobacter sphaeroides

Les électrons retournent au cycle des oxydoréductions par ce canal. La pièce essentielle est évidemment le dimère formé des deux molécules de BChl désignées dans la littérature par $\mathbf{D_A}$ et $\mathbf{D_B}$. C'est là que se fait la séparation des charges, qui survient en quelques picosecondes après l'arrivée de chaque exciton. Le croquis est une image simplifiée du centre réactionnel de *R. sphaeroides* où seuls sont indiqués les chaînes L, M, et leurs cofacteurs.

Les autres cofacteurs forment deux chaînes de transport d'électrons vers le site Q_B, l'une étant utilisée plus souvent dans L que l'autre. Les transferts sont très rapides (inférieurs à la nanoseconde). Les deux sites de fixation des quinones n'auraient pas la même valeur. Une quinone en Q_A est fermement liée au complexe, alors qu'en Q_B elle apparaît comme échangeable avec les quinones de la membrane. Le rôle du fer n'est pas clairement cerné. La symétrie de l'ensemble n'est pas parfaite. Le cheminement préféré des électrons est du côté L par BchlA et BphA, Q_A et Q_B. Cette dernière est le véritable point de sortie du pouvoir réducteur vers la membrane. Les quinones membranaires font partie d'une chaîne de transport d'électrons analogue à une chaîne respiratoire faisant appel à un cytochrome bc_1, qui effectue une translocation de protons hors du cytoplasme bactérien.

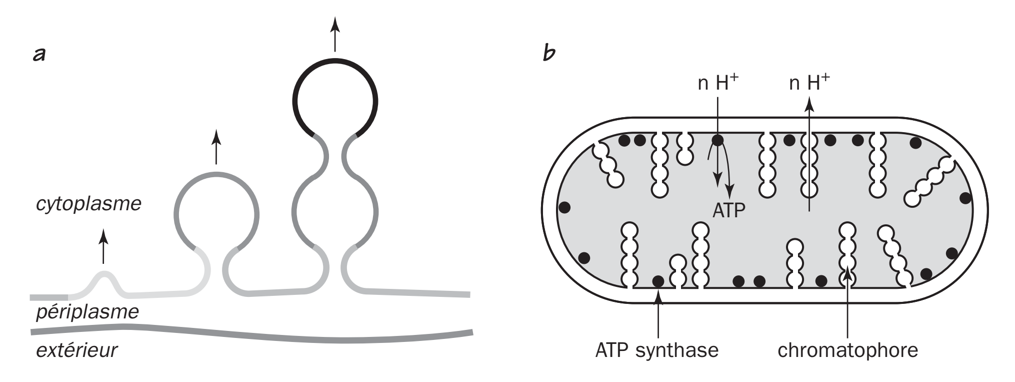
Pour approvisionner le centre réactionnel en excitons, les antennes des bactéries pourpres sont constituées de complexes LH (pour "*light-harvesting*") disposés tout autour par un assemblage qui est une autre merveille. Les LH sont de deux sortes. Les LH-1, appelés aussi B875, entourent directement le centre réactionnel. Les LH-2 (ou B800-850) forment un ensemble périphérique d'importance variable en fonction des conditions. La structure d'ensemble présente de profondes analogies dans tous les cas de figure, avec quelques variantes seulement **[36]** Les similitudes sont soulignées par les homologies de séquence entre les polypeptides. Ces complexes ont une organisation rigoureuse de telle sorte que les excitons peuvent se transmettre de l'une à l'autre à très grande vitesse jusqu'au centre réactionnel sans dissipation en chemin avec un rendement de 95%. La structure des LH est faite d'un multiple de paires $\alpha\beta$ où les chaînes α et β sont organisées en hélices alpha traversant la membrane. Ainsi dans chaque LH-1 de *R. sphaeroides*, chaque paire $\alpha\beta$ est associée à 2 molécules de bactériochlorophylle et 2 molécules de caroténoïde, tous les dimères formant une couronne de 16 unités autour du centre réactionnel. De la même façon, les paires $\alpha\beta$ des LH-2 sont arrangées en couronne avec un nombre défini de molécules de pigment (3 BChl) **[37]**.

Un nouveau croquis tente d'expliquer la nature des relations entre les complexes antennaires LH et les centres réactionnels où se fait la séparation des charges. En *a*, le centre réactionnel est symbolisé comme vu latéralement dans la membrane et on reconnaît la disposition de la figure précédente. En *b*, le plan de la page est celui de la membrane. Le dimère de BChl est symbolisé par les deux petites barres noires et le signe +/–. Les 16 sous-unités de LH-1 entourent le centre réactionnel, les excitons voyagent rapidement d'un pigment à l'autre vers le centre réactionnel qui les "traite" un à un.



a - Centre réactionnel *b - Complexes antennaires*

Tout cet appareillage moléculaire est mis en place selon des régulations très strictes obéissant aux différentes conditions, et varie avec les espèces. Ainsi chez *Rhodopseudomonas capsulatus* une chute brusque de l'intensité lumineuse entraîne l'arrêt de la croissance. De nouvelles synthèses sont induites. Le nombre des centres réactionnels est multiplié par 5, et la masse des pigments antennaires qui entoure chaque centre est doublée **[38]**. Il y a en même temps augmentation d'efficacité générale de la collecte d'énergie lumineuse. L'accélération de la synthèse concerne à la fois la formation des pigments et des polypeptides associés. Les nouvelles molécules de protéine s'assemblent dans la membrane autour des molécules de pigment pour former des complexes fonctionnels. Les bactéries pourpres sont en général dépigmentées en aérobiose et à l'obscurité. Certaines espèces continuent à faire du pigment dans le noir complet à condition qu'il n'y ait pas d'oxygène. Celui-ci est donc un facteur critique et l'appareil photosynthétique ne se développe à la lumière que si le taux d'oxygène est faible ou nul. La synthèse de la bactériochlorophylle apparaît comme l'opération la plus sensible à l'oxygène, avec de grandes différences selon les espèces. *Rhodobacter capsulatus* est très aérotolérant et fait encore un peu de pigment dans un milieu en équilibre avec l'air ambiant, tandis que *Rhodospirillum rubrum* n'en fait plus.

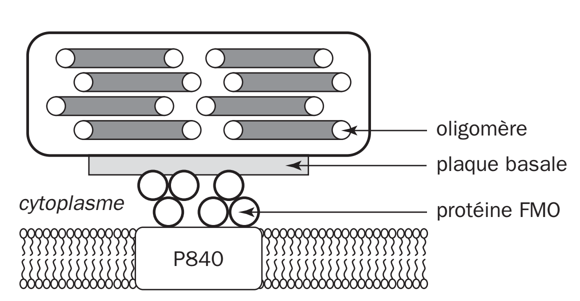


Chromatophores

Finalement, tout l'appareil photosynthétique des bactéries pourpres est logé dans des excroissances membranaires internes, de développement plus ou moins grand avec les conditions, de forme variable selon les espèces, appelées chromatophores (*a*), et disposées comme en *b*. Les protons rejetés par les oxydoréductions entrent à nouveau en déterminant une synthèse d'ATP.

Nous n'évoquerons que très rapidement le cas des bactéries vertes. Elles sont remarquables par leur phobie absolue de l'oxygène et leur capacité à se développer en lumière très faible grâce à leurs chlorosomes contenant un pigment antennaire particulier (BChl c), polymérisé en grande quantité dans des bâtonnets membranaires.

Les chlorosomes, symbolisés par le diagramme *b*, apparaissent comme un sac allongé d'une longueur d'environ 200 nm, bourré principalement de BChl c polymérisée en cordons ou en bâtonnets. Les chlorosomes sont reliés à la face interne de la membrane par une plaque basale contenant de la BChl a et des protéines organisées en trimères appelées FMO dans la littérature [21].



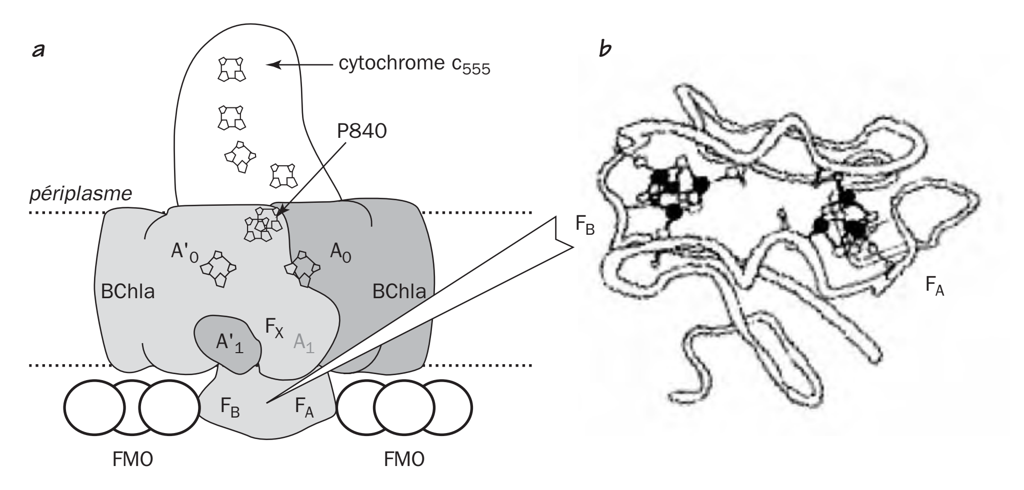
Chlorosome

La bactériochlorophylle c n'est présente que dans les chlorosomes. On estime que chacun contient plus de 200 000 de ces molécules, de telle sorte que le rapport serait de 10 000 à 20 000 BChl c par centre réactionnel. Les chlorosomes apparaissent donc comme les dispositifs antennaires les plus étendus et les plus performants connus pour capter la lumière. Les bactéries vertes sulfureuses peuvent se développer dans des eaux anoxiques profondes et riches en sulfure, où la lumière parvient difficilement sous la végétation aquatique et les particules en suspension. Un certain nombre de protéines des chlorosomes ont été répertoriées, une dizaine au moins, parmi lesquelles trois sont en quantité majeure **[39]**. Ces antennes sont adaptables. Un mécanisme régulateur supprime toute photosynthèse en cas d'exposition à des traces d'O_2, et les trimères FMO seraient des valves chargées de ce réglage **[40]**. Les excitons nés dans les chlorosomes parviennent en quelques picosecondes aux centres réactionnels par la plaque basale et les trimères FMO, et cette énorme efficacité passionne de nombreuses recherches en biophysique, avec l'espoir de concevoir des modèles artificiels. Chose curieuse, *C. tepidum* peut se passer de ses chlorosomes. Il suffit pour cela qu'une mutation empêche la synthèse de la BChl c. Les bactéries nécessitent alors un éclairement plus fort et leur photosynthèse repose sur la BChl a et des caroténoïdes **[41]**.

---

21 - Ou protéines FENNA-MATTHEWS-OLSON, du nom des découvreurs. Elles sont absentes dans les bactéries vertes non sulfureuses du type Chloroflexus.

Les centres réactionnels des sulfureuses vertes ont des analogies structurales avec ceux des bactéries pourpres, notamment par l'existence de deux sous-unités principales porteuses de cofacteurs assurant les transferts d'électrons. Alors que chez les bactéries pourpres existe une dissymétrie fondamentale (chaînes L et M) portant deux voies de transfert, dont l'une est privilégiée par rapport à l'autre, le centre réactionnel de *Chlorobium limicola* ou de *C. tepidum* apparaît comme symétrique. En effet il n'y a qu'un seul gène pour coder les deux parties essentielles. La structure de base est un homodimère auquel s'ajoutent plusieurs sous-unités.



Centre réactionnel de bactérie verte sulfureuse

Deux voies de transfert d'électrons partent du donneur primaire (le P840 constitué de deux BChl a), avec bactériophéophytine (A_0, A'_0), des sites occupés par des quinones (A_1, A'_1), un noyau fer-soufre (F_x) occupant la position où se trouve du fer chez les bactéries pourpres. Du côté cytoplasmique se trouve une partie détaillée en B, construite comme une ferrédoxine, portant deux noyaux [4Fe-4S] et désignés par F_A et F_B. Le centre réactionnel renferme 2 molécules de caroténoïde. De nombreuses molécules antennaires de BChl a (16 au total) l'entourent. Il est au contact de deux trimères FMO contenant 42 BChl a et placés au contact du chlorosome **[42]**.

En conclusion de cette partie, nous voyons que les bactéries photosynthétiques non oxygéniques vivent le plus souvent sinon exclusivement en anaérobiose. Leur importance dans les cycles naturels et les biodégradations est sans doute plus faible que celle des cyanobactéries, par lesquelles nous terminerons ce chapitre. Mais elles nous aident sur le plan fondamental à mieux comprendre les mécanismes de la captation de l'énergie lumineuse dans la photosynthèse. Ces bactéries représentent sans doute des dispositifs ancestraux, antérieurs à la montée de l'oxygène dans l'atmosphère terrestre, et repris par les cyanobactéries dont des formes cousines ont conduit aux chloroplastes des plantes. Les cyanobactéries et les chloroplastes, support d'une photosynthèse oxygénique, on copié la structure des centres réactionnels vus précédemment. Cette photosynthèse utilisant deux photosystèmes différents, le PS1 et le PS2, dériverait pour le premier du photosystème des bactéries pourpres, et pour le second de celui des bactéries vertes.

1.8 - LES CYANOBACTÉRIES

Il n'existe probablement aucun endroit de la biosphère qui ne soit pourvu de cyanobactéries. On les appelait algues bleu-vert, cyanophycées, cyanophytes. Elles ne font que ressembler aux algues sans appartenir à cette catégorie, car ce sont des procaryotes. Leur importance, ou plutôt celle des formes ancestrales des cyanobactéries, semble avoir été colossale dans l'histoire de la vie. Les formes les plus anciennes remonteraient à plus de trois milliards d'années. Elles sont révélées par les **stromatolites** fossiles, figures feuilletées ou ondoyantes en pelures d'oignon inscrites dans la pierre. On en connaît la signification parce que des formes vivantes équivalentes se trouvent sur la côte Nord-Ouest de l'Australie (Shark Bay). Les cyanobactéries forment ces structures par alternance de proliférations cellulaires et de dépôts de carbonate de calcium. Une nouvelle couche se formait au-dessus, et ainsi de suite. Des stromatolites fossiles ont été détectés dans des terrains d'âge varié [22]. Ces organismes ont été probablement les initiateurs de la **photosynthèse oxygénique**, productrice d'oxygène moléculaire. Ils n'étaient sans doute pas les premiers à faire une photosynthèse. Ils auraient pris la relève d'organismes antérieurs qui devaient utiliser les ions ferreux et H_2S comme donneurs d'électrons, et auraient été à l'origine des deux types de centres réactionnels appelés PS1 et PS2. Une baisse de l'anhydride carbonique atmosphérique sous l'effet de la photosynthèse a sans doute été le résultat de leur activité, provoquant une diminution de l'effet de serre et un important refroidissement [23]. Les chloroplastes des algues et plantes vertes sont les héritiers d'anciennes cyanobactéries symbiotiques. Cette hypothèse est corroborée par un large faisceau d'observations biochimiques et génétiques convergentes.

Les cyanobactéries les plus anciennes ont laissé leur signature chimique sous forme de bactériohopane-polyols (PHP). Ces produits servent à rigidifier la paroi et sont souvent méthylés en position 2, tels les 2-méthylhopanes dont les cyanobactéries actuelles ont pratiquement l'exclusivité au sein de la microflore (R désigne une partie glucidique).

2-Méthylhopanes

22 - *Les stromatolites fossiles bien conservés sont néanmoins peu communs. Il y en a dans le Trias en Allemagne (région de Hanovre). Un beau gisement précambrien se trouve en Mauritanie près d'Atar. Parmi les plus anciens se trouvent ceux du Canada. Les formations australiennes actuelles sont côtières et juste au-dessous de la limite des marées.*

23 - *Cette hypothèse émise par JL. KIRSCHCINK et autres chercheurs californiens, est celle de le "Terre boule-de-neige". Une longue glaciation aurait affecté une grande partie du globe au Précambrien jusqu'à l'Ordovicien. Son origine est probablement plus complexe, ainsi que le réchauffement qui s'est accompagné d'une explosion de formes animales regroupant déjà toutes les grandes lignées animales modernes.*

Le noyau principal est à peu de chose près celui des stérols eucaryotiques dont la structure est donc particulièrement "ancienne", car des lipides de structure très voisine ou géohopanes ont résisté au temps et ont été vus dans des schistes bitumineux âgés de 2,5 milliards d'années, jusqu'aux terrains sédimentaires du Tertiaire. Le noyau des hopanes est extrêmement stable, résistant à la biodégradation, lié à du soufre et incorporé aux kérogènes, supportant un léger métamorphisme avec des modifications mineures comme la réorientation du méthyle.

Les cyanobactéries forment un groupe d'organismes particulièrement résistants et adaptables à toute sorte de conditions. La séquence génomique complète d'un *Anabaena* est disponible **[43]** ainsi que celle d'une espèce, *Nostoc punctiforme*, remarquable par la diversité de ses habitats et sa capacité d'entrer en symbiose avec divers végétaux **[44]**. Capables de supporter de grands écarts de température et de salinité, les cyanobactéries contribuent de manière importante à la microflore des déserts et représentent une part majeure de la biomasse océanique. Les espèces les plus abondantes dans les océans sont des *Synechococcus* unicellulaires et des *Trichodesmium* filamenteuses. Le picoplancton des océans renferme des quantités prodigieuses de cyanobactéries dans une zone comprise entre la surface et – 100 m. Leur impact sur les cycles du carbone et de l'azote est probablement énorme, non seulement par la photosynthèse, mais aussi par l'assimilation de l'azote. Les cyanobactéries sont également très communes dans les lacs, les eaux courantes et les sols. Les formes filamenteuses sont abondantes en zone littorale et dans les mers peu profondes. Une espèce comme *Nostoc commune* est répandue sur tout le globe, des régions polaires aux régions tropicales. Une autre forme, *Cyanidium caldarium*, peut se développer dans des sources chaudes à plus de 60-70°C. Elles compensent leur multiplication plus lente par rapport à d'autres organismes en exerçant une compétition vitale acharnée où est mise en jeu la fabrication d'une grande variété de substances à vocation antibiotique. Une propriété commune aux cyanobactéries et aux algues marines comme les Rhodophytes (algues rouges) est la synthèse de composés halogénés à partir des chlorures, bromures et iodures de l'eau de mer à l'aide de chloro- et bromoperoxydases **[45]**.

Les cyanobactéries présentent un certain nombre de caractères essentiels résumés ici brièvement. Leurs cellules procaryotiques vivent à l'état séparé ou en filaments pluricellulaires selon les espèces. Divers critères biochimiques, comme la présence de peptidoglycanes, les rapprochent des protéobactéries. À l'instar des végétaux supérieurs, les cyanobactéries ont deux photosystèmes **PS1** et **PS2**, mais ne contiennent que la **chlorophylle a** (pas de **chlorophylle b** comme chez les plantes). Les pigments antennaires sont constitués de chlorophylle et de **phycobilines**, qu'on ne retrouve que dans des groupes très limités d'eucaryotes (algues rouges). Ces pigments participent à la collecte de la lumière, et entrent dans la composition de complexes particuliers appelés **phycobilisomes**. L'assimilation du gaz carbonique à la lumière se fait par le cycle de CALVIN, et des particules intra-cellulaires spéciales, ou carboxysomes, sont des réservoirs de la *Rubisco**. Une **anhydrase carbonique** intracellulaire puissante jointe à un transport du bicarbonate[24] permet aux

24 - *Le gaz carbonique traverse facilement les membranes biologiques, à la différence des ions.*

cyanobactéries d'utiliser ce dernier comme source de carbone et de s'adapter aux milieux alcalins plus facilement que les algues vertes (*voir DIC**).

La photo-autotrophie est un régime quasi obligatoire pour la majorité des cyanobactéries. Elles n'ont généralement qu'une aptitude limitée à consommer les substrats organiques carbonés qu'on leur offre à l'obscurité en culture. La **vie hétérotrophe** en présence d'oxygène, est possible chez certaines espèces, mais ne donne lieu qu'à une croissance lente, à quelques exceptions près comme *Oscillatoria terebriformis*, une espèce thermophile qui peut survivre sans oxygène et à l'obscurité en faisant une fermentation lactique du glucose ou du fructose **[46]**. L'hétérotrophie des cyanobactéries repose généralement sur l'utilisation des réserves internes et facilite leur adaptation à l'alternance entre le jour et la nuit On a tenté d'expliquer cette propriété par l'absence de systèmes de transport adéquats ou d'enzymes clés du métabolisme intermédiaire. En fait la situation réelle paraît plus complexe. Certaines cyanobactéries tirent un bénéfice de l'alternance jour/nuit, et paraissent adapter leur métabolisme carboné à l'absence de lumière **[47]**. *Anabaena variabilis* pousse lentement à l'obscurité sur saccharose, glucose, fructose ou autres glucides **[48]**, et des facilités du même genre ont été maintenant reconnues dans plus d'une vingtaine d'espèces. L'oxydation des glucides à l'air en l'absence de lumière existe chez des espèces spécialisées qui utilisent de préférence la voie des pentose-phosphates, le cycle de KREBS y étant généralement incomplet par défaut de la 2-oxoglutarate déshydrogénase. L'enzyme essentielle est la glucose-6-phosphate déshydrogénase, qui est activée par oxydation et inhibée par réduction. Elle pourrait donc avoir une fonction régulatrice dans un mécanisme de contrôle dont l'oxygène serait le signal initial **[49]**. La désactivation de l'enzyme en anaérobiose obligerait les cellules concernées à se rabattre sur une fermentation de survie produisant de l'ATP comme énergie de secours.

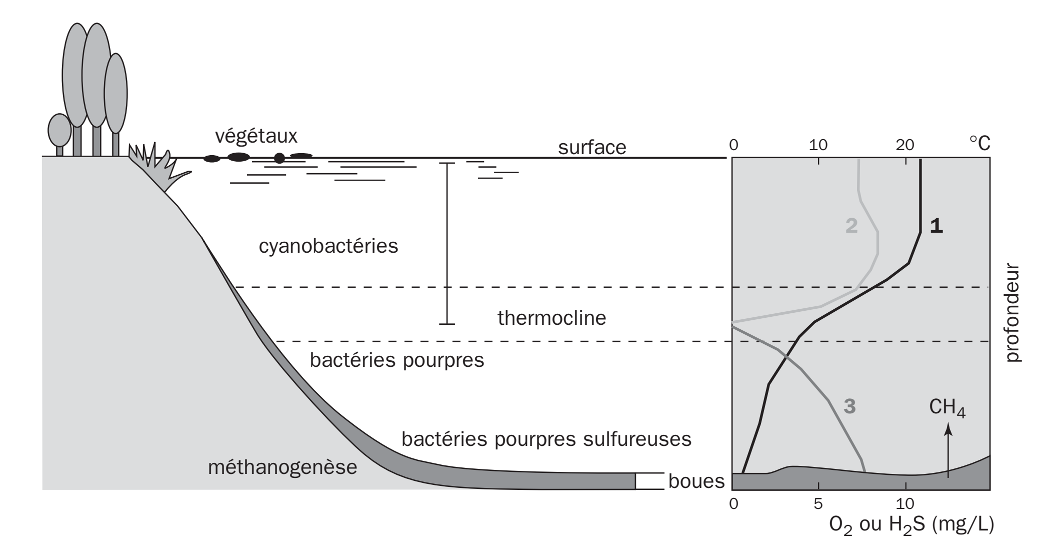
De nombreuses espèces réduisent l'azote atmosphérique et libèrent de l'hydrogène par la nitrogénase, mais celle-ci craint la présence d'O_2. Une adaptation spéciale consiste à ne faire fonctionner la nitrogénase que lorsqu'il n'y a pas d'oxygène. À cela existent deux solutions majeures. La première est de ne faire fonctionner la nitrogénase qu'au cours de l'obscurité nocturne quand la photosynthèse est arrêtée et ne produit plus d'O_2. La seconde est de faire assimiler l'azote par des cellules spéciales, appelées **hétérocystes**, dont la différenciation met en jeu le réglage de plus de 60 gènes. Le métabolisme y est modifié, la nitrogénase y est induite et la production d'O_2 est ramenée au minimum par arrêt du photosystème 2 (PS2).

Les cyanobactéries dans leur ensemble fabriquent une variété considérable de produits secondaires comme des toxines ou des terpènes volatils comme la **géosmine** et le 2-méthyl-isobornéol qui sont connus pour donner à dose infime un mauvais goût à l'eau. Les espèces toxiques se trouvent surtout dans les eaux douces [25] en provoquant parfois des intoxications chez les animaux. L'anatoxine-a est un poison neuromusculaire produit par certaines souches *d'Anabaena flos-aquae*, les microcystines sont des neurotoxiques de *Microcystis aeruginosa* **[50]**. La

25 - *En milieu marin, les intoxications estivales des bords de mer par des floraisons intempestives d'"algues" sont dues principalement à des dinoflagellés.*

nodularine est un pentapeptide de *Nodularia spumigena*. La structure détaillée de ces produits est connue **[51]**. Leur action toxique est de bloquer les protéine phosphatases à sérine et thréonine (PP-1, PP-2A) dont l'intervention est cruciale dans les régulations métaboliques cellulaires. Ces toxines sont le plus souvent des polypeptides à structure cyclique comportant des acides aminés inhabituels. Diverses toxines restent incomplètement caractérisées. Elles accompagnent des proliférations périodiques constatées dans des lacs ou étangs partiellement eutrophisés, et ont des effets dommageables sur la faune piscicole. La cyanobactérine est un composé de nature aromatique qui s'avère toxique à une dose de 5 µM pour d'autres formes cyanobactériennes et permet à *Scytonema hofmanni* de se maintenir malgré la concurrence d'espèces plus performantes. La cyanobactérine agit comme un herbicide naturel sur le photosystème 2 et fait sentir ses effets sur les plantes vertes. Un taux de 1 µM suffit à inhiber la prolifération des lentilles d'eau (*Lemna gibba*) **[52]**, pourtant réputées très envahissantes sur les plans d'eau. Enfin l'espèce coloniale *Microcystis flos-aquae* est une forme abondante dans les lacs d'eau douce alcalins où elle prolifère volontiers au sein d'une gangue muqueuse de polysaccharides à forte teneur en acide galacturonique. Elle contribue ainsi à former ce qu'on appelle les "fleurs d'eau". Cette gangue fortement anionique fixe facilement des ions métalliques et se comporte comme un agent gélifiant aux propriétés qui rappellent les pectines des plantes **[53]**. Retenons donc les cyanobactéries comme des colonisateurs agressifs, capables de lutter contre la concurrence en s'aidant de substances toxiques ou antibiotiques variées, et de vivre dans une multiplicité de milieux difficiles. Leur présence dans l'environnement est donc bien loin d'être neutre.

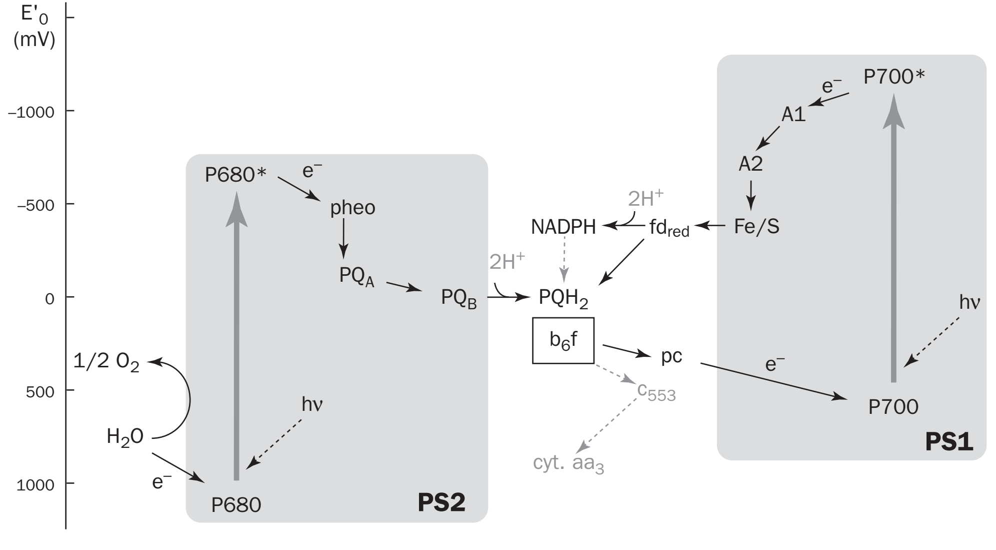
La prolifération des cyanobactéries conjointement à celle des algues devient importante dans les milieux aquatiques eutrophisés par le déversement de matières organiques et de phosphate. Le croquis et le graphique représentent une coupe dans un milieu aquatique où s'établit une stratification thermique entre les eaux plus chaudes en surface (en été) et une zone profonde plus dense et plus froide.



Un gradient de séparation en eau calme, la **thermocline**, sépare aussi la partie la plus oxygénée près de la surface et la profondeur, plus ou moins anoxique et riche en sulfure près du fond.

Le graphique représente la température (**1**), l'oxygène dissous (**2**) et la teneur en H_2S (**3**). La photosynthèse non oxygénique se tient dans la zone la moins oxygénée ou complètement anaérobie sous la thermocline. Munies de vacuoles à gaz qui leur permettent de monter et descendre dans l'eau à la manière d'un ludion, les cyanobactéries libres sont capables d'ajuster en même temps la sensibilité spectrale et l'étendue de leurs pigments antennaires, de façon à optimiser la captation de la lumière.

Les cyanobactéries ressemblent à des chloroplastes isolés. Leur appareil photosynthétique est logé comme ceux-ci dans la paroi de sacs membranaires internes appelés thylakoïdes. Le schéma en "Z" de la photosynthèse avec les deux photosystèmes PS1 et PS2 ressemble à celui des plantes vertes.



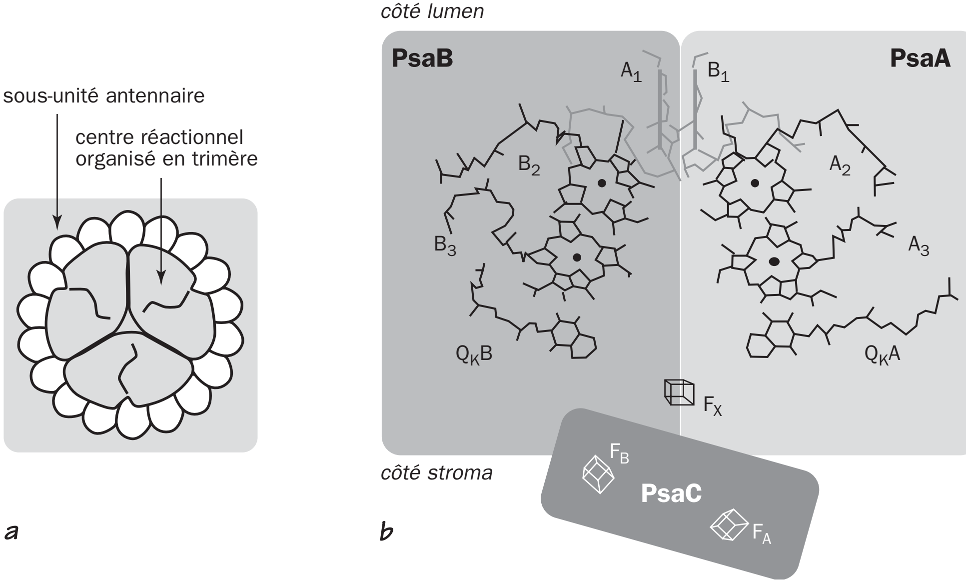
Pheo - phéophytine **b$_6$f** - cytochrome complexe de type bc$_1$
PQ - phylloquinones **Fd** - ferrédoxine
Pc - plastocyanine **A1, A2, Fe/S** - noyaux fer-soufre

PS1 et PS2 des cyanobactéries

On note dans ce schéma un détail important qui est la présence d'une véritable chaîne respiratoire dont le cytochrome complexe b_6f fait partie. L'accepteur final est O_2 par une cytochrome c oxydase. Le b_6f, qui est en fait un complexe bc_1, permet une récupération d'énergie comme précédemment chez les bactéries pourpres et vertes. Les cyanobactéries peuvent donc oxyder des substrats exogènes sur l'oxygène sans utiliser la lumière. Les PS1 et PS2 des cyanobactéries sont homologues sur le plan structural des photosystèmes trouvés respectivement chez les bactéries vertes et pourpres. La structure détaillée des centres de *Synechococcus* a été déterminée par cristallographie avec une résolution de 2,5 Å

(PS1) **[54]** et de 3,8 Å (PS2) **[55]** L'avancée considérable des connaissances sur la question devrait éclairer la structure des PS des chloroplastes. Les centres réactionnels ont toujours deux sous-unités fondamentales de structure hydrophobe avec une charpente d'hélices alpha traversant la membrane, et portant les cofacteurs essentiels comme nous l'avons vu chez les bactéries. Autour de ces noyaux centraux sont disposées d'autres sous-unités et l'ensemble est entouré par les complexes antennaires.

Les centres réactionnels **PS1** sont organisés en trimères, comme sur la figure dans la partie *a*, où la membrane serait dans le plan de la page. Chacun des monomères a 12 sous-unités, les plus importantes appelées PsaA, PsaB et PsaC autour desquelles gravitent 9 plus petites et 3 placées au-dehors de la membrane. Les cofacteurs sont nombreux, soit 127 au total. Qu'on en juge : 96 chlorophylles a, 3 noyaux fer-soufre [4Fe-4S], 2 molécules de phylloquinone, 22 molécules de caroténoïde et 4 de lipides !



PS1 de Synechocystis

Parmi les molécules de **chlorophylle a**, six sont logées dans les sous-unités principales PsaA et PsaB, et leur disposition relative est représentée dans la partie *b* de la figure. Les lettres A et B font référence à sous-unité qui les lie, notamment par leur magnésium. Le dimère essentiel de chlorophylle où se fait la séparation de charges est A_1B_1 et représente le P700. Sont présentes également les deux molécules de phylloquinone (Q_KA, Q_KB), un centre fer-soufre à cheval sur les deux parties et deux autres, F_A et F_B, localisés dans la sous-unité PsaC faisant saillie dans le stroma. La structure est hautement conservée dans l'évolution jusqu'aux plantes, notamment les acides aminés qui coordonnent le magnésium des molécules de chlorophylle. Il y a donc deux branches par lesquelles peuvent s'effectuer les transferts d'électron. Par suite de la petite dissymétrie entre PsaA et PsaB, les deux voies ne fonctionnent probablement pas avec la même fréquence.

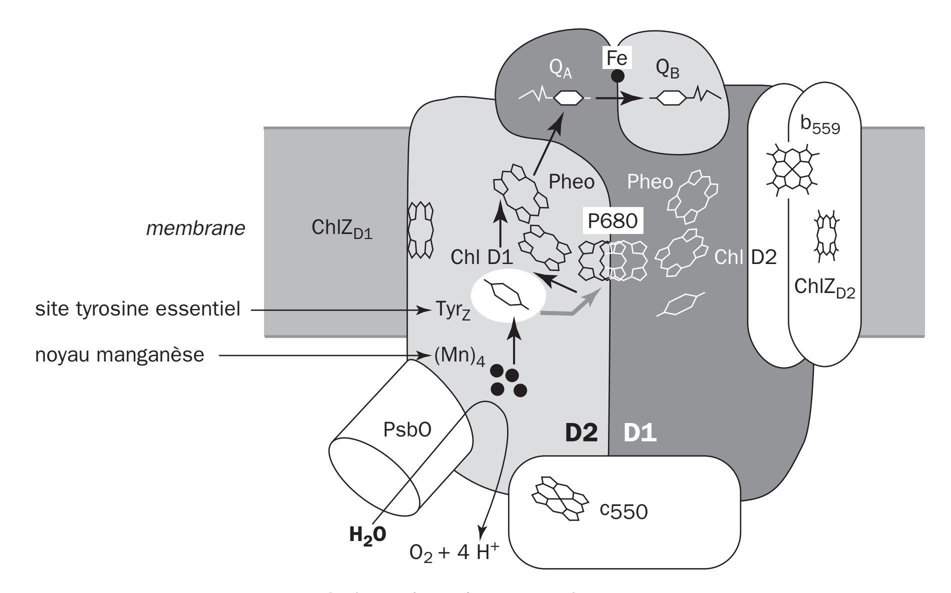
Les excitons acheminés par les pigments antennaires arriveraient préférentiellement du côté PsaB. Le P700 est rechargé du côté lumen (en haut de la figure), donc sur la face externe par rapport au cytoplasme. Les électrons sont émis de l'autre côté par PsaC (en passant par F_x) et pris en charge par une ferrédoxine. Cet édifice moléculaire est extraordinaire. Les sous-unités PsaA et PsaB portent en plus des 6 molecules A et B, un total de 79 molécules de chlorophylle a, dont la plupart, non représentées, font office de pigments antennaires. Restent 11 sur les 96, attachées aux petites sous-unités périphériques. Le PS1 fonctionne donc comme une unité intégrée, recevant l'énergie lumineuse par sa chlorophylle et son carotène, émettant un à un dans le stroma des électrons à très bas potentiel, et rechargé du côté lumen par la plastocyanine, une petite protéine contenant du cuivre, et le cytochrome c_6.

Le **PS2** est la seconde pièce de l'appareil photosynthétique des cyanobactéries. Sa double originalité et d'être muni d'un dispositif à manganèse permettant la **photolyse de l'eau**, et de complexes antennaires spéciaux où l'on trouve la chlorophylle a, des caroténoïdes, et surtout des **phycobilisomes**. Ces derniers renferment des pigments particuliers appelés phycobilines. Les caroténoïdes ont comme ailleurs un double rôle de récepteur et de protecteur contre la formation d'oxygène singulet. Ils sont généralement difficiles à localiser dans les structures déduites de la diffraction des rayons X, car ils sont souvent trop mobiles pour occuper une place rigoureusement constante d'un PS2 à un autre. Le PS2 ne renferme pas moins de 17 sous-unités dont 14 sont dans la membrane du thylakoïde. Là encore, le centre réactionnel renferme deux sous-unités majeures porteuses des cofacteurs essentiels, désignées par D1 (PsbA) et D2 (PsbD), selon un arrangement "pseudo-symétrique". Ces deux protéines sont homologues l'une de l'autre par la séquence et la structure, et il est visible que les gènes psbA et psbD dérivent d'une duplication ancestrale, qui a dû conduire à un avantage sélectif puisqu'on retrouve ce caractère dans tous les centres réactionnels que nous avons rencontrés à l'exclusion de celui des bactéries sulfureuses vertes (où l'arrangement est symétrique). Il faut donc s'attendre à trouver là encore deux voies possibles pour le transfert des électrons un à un à l'intérieur du centre, l'une étant privilégiée par rapport à l'autre. Il est vraisemblable que ces deux voies correspondent à une possibilité d'adaptation en fonction des conditions, par exemple un effet régulateur ou amortisseur permettant le transfert des électrons sans à-coups.

Le schéma s'inspire d'un article de RUTHERFORD et FALLER **[56]** et représente le cœur du PS2, constitué par les polypeptides fondamentaux D1 et D2, leurs cofacteurs et quelques pièces annexes.

Le PS2 est homologue du photosystème des bactéries pourpres mais en plus compliqué. Une pièce essentielle est le noyau manganèse qui contient 4 ions Mn^{2+} capables de s'oxyder en Mn^{3+}. L'ensemble peut donc acheminer successivement 4 électrons par une échelle de transferts radicalaires, catalysant la photolyse de l'eau : $2\ H_2O \rightarrow O_2 + 4\ H^+ + 4\ e^-$. Ces électrons transitent jusqu'au P680 par l'intermédiaire d'une position radicalaire essentielle portée par Tyr_Z. Chaque électron émis par le 680 après séparation de charge voyage par une phéophytine vers Q_A puis Q_B, qui oscille entre l'état Q_B, et l'état radicalaire $Q_B°$.Chaque fois que

cette plastoquinone "mobile" Q_B a reçu un électron deux fois de suite, elle est transformée avec l'apport de deux protons en Q_BH_2, abandonne le PS2, et une nouvelle molécule de Q_B la remplace. La plastoquinone est donc le point de sortie des électrons provenant de l'eau. Le PS2 est bordé par des sous-unités internes à fonction antennaire, désignées par CP43 et CP47, contenant respectivement 12 et 14 molécules de chlorophylle a, organisées en 2 couches parallèles au plan de la membrane. Dans cet environnement complexe s'observent deux molécules de chlorophylle particulières, notées sur le schéma par $ChlZ_{D1}$ et $ChlZ_{D2}$. Leur fonction est peut-être d'acheminer les excitons à partir des pigments antennaires vers le P680, mais cela ne reste qu'une hypothèse.



PS2 de Sybecchoccus elongatus

La forte originalité de l'antenne de PS2 est la présence des phycobilines, des tétrapyrroles apparentés aux porphyrines, mais non refermés en couronne comme ces dernières. Les phycobilines sont rattachées à des protéines porteuses par une ou deux liaisons covalentes sur fonction thiol. Les protéines sont les **phyco-biliprotéines** et les pigments leur sont liés par des segments de séquence que l'évolution a conservés. La plupart des cyanobactéries en ont au moins trois, caractérisées par leur maximum d'absorption. Les voici en ordre d'abondance décroissante : des **phycocyanines** ou PC (620 nm), proches des phytochromes végétaux, l'**allophycocyanine** ou APC (650 nm), et l'**allophycocyanine B** ou APCB (670 nm). De nombreuses espèces ont en outre de la **phycoérythrocyanine** ou PE (568 nm) et des **phycoérythrines B** et **R** (546 et 565 nm). Voici deux exemples de ces pigments représentés attachés à leur protéine par un ou deux ponts thioéther [26].

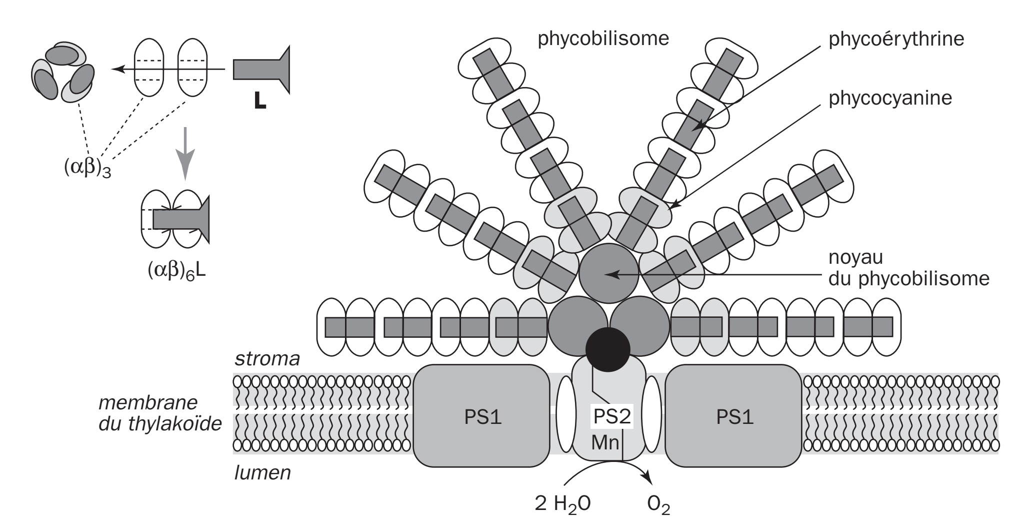
---

26 - Le lien s'établit chimiquement par une réaction d'addition du thiol sur une chaîne latérale vinylique -CH=CH_2. Une disposition semblable existe aussi dans les cytochromes c entre porphyrine et protéine.

phycocyanobiline **phycoérythrobiline**

Exemples de phycobilines

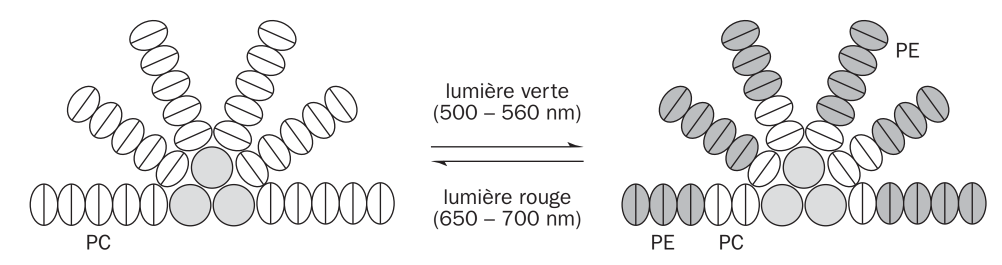
Les phycobiliprotéines absorbent donc à différentes longueurs d'onde et sont logées dans des complexes antennaires spéciaux associés au PS2 et appelés **phycobilisomes**. Leur nom et les bilines associées sont indiqués en glossaire. L'organisation des phycobilisomes obéit à un plan caractéristique. Les principales protéines porteuses de phycobilines (1, 2 ou 3 molécules par peptide, attachées par pont thioéther) correspondent à deux catégories de sous-unités α et β. Ces protéines sont groupées en trimères de composition $(\alpha\beta)_3$ formant un anneau muni d'un trou central d'un diamètre d'environ 100 Å. Deux anneaux $(\alpha\beta)_3$ superposés en $(\alpha\beta)_6$ s'emmanchent sur une sous-unité spéciale dépourvue de pigment et appelée "*linker*" (L). L'unité élémentaire ainsi formée a donc pour formule $\mathbf{(\alpha\beta)_6L}$. Les phycobilisomes portent ainsi sur un noyau central des bâtonnets dirigés en éventail (il y en a habituellement 6), constitués par des chaînes d'unités $(\alpha\beta)_6$L.



Appareil photosynthétique des cyanobactéries

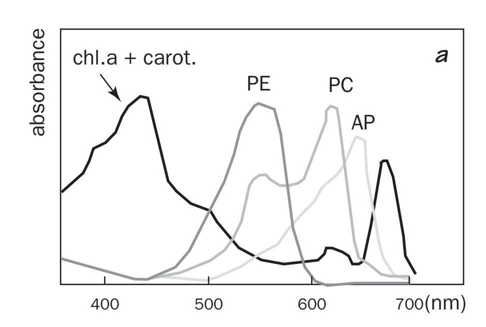
Le noyau central a une composition spéciale. Il est constitué d'un trimère d'**allophycocyanine,** absorbant dans le rouge lointain du spectre, lié à un linker particulier de masse moléculaire élevée et désigné dans la littérature par L_{CM}. L'énergie captée par les bâtonnets est canalisée vers le noyau qui la transmet directement au PS2. Ce dispositif est extraordinaire, car le développement et la composition en pigments des phycobilisomes est tributaire des conditions

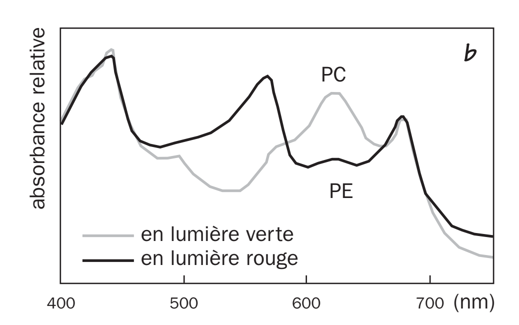
physiologiques. Les phycobilisomes régressent en cas de carence nutritionnelle (les pigments servent de réserve azotée et sont recyclés). Ils régressent également en lumière vive, qui a pour effet de provoquer un fort abaissement du potentiel redox interne. De nombreuses espèces de cyanobactéries vivant en milieu aquatique, comme les *Anabaena*, sont décolorées sous un éclairement fort. La composition des bâtonnets en phycobilines varie en fonction de la qualité spectrale de la lumière. C'est le phénomène le plus intéressant, appelé **adaptation chromatique**. Les unités les plus proches du noyau contiennent essentiellement de la phycocyanine dont le maximum d'absorption est dans le rouge. Les zones périphériques ont comme constituant principal une phycoérythrine, dont l'absorption est dans le vert. L'adaptation joue sur le développement de la phycoérythrine par rapport à la phycocyanine. La première prend le pas sur la seconde en lumière verte. C'est l'inverse en lumière rouge.



Adaptation chromatique

Les cyanobactéries sont donc capables de se développer à la lumière verte tamisée des milieux aquatiques quand l'éclairement de surface est en partie intercepté par des végétaux verts. Cette partie du spectre est celle où la chlorophylle est la moins efficace. Il y a un autre aspect, avec l'action conjointe de la turbidité du milieu et de la profondeur de l'eau. Un milieu trouble devient de plus en plus opaque au fur et à mesure que la longueur d'onde de la lumière diminue. Le rouge passe donc mieux que le bleu. Inversement les radiations rouges sont plus fortement absorbées par l'eau que les courtes longueurs d'onde. Conséquence : la lumière verte est un moyen terme, une eau profonde et trouble est éclairée en vert. Les cyanobactéries ont donc la possibilité de moduler la composition de leurs phycobilisomes en fonction de la qualité de l'éclairement **[57]**.





Absorbance de F. diplosiphon en suspension

Le graphique montre en *a* les zones d'absorption des différents pigments : la chlorophylle a et les caroténoïdes, la phycoérythrine (PE), la phycoyanine (PC) et l'allophycocyanine (AP). En *b*, changement d'absorbance des cellules en suspension selon la couleur de la lumière incidente. La puissance d'adaptation des cyanobactéries est donc remarquable et les rend compétitives dans nombre de niches écologiques. Leur faculté de se développer dans des milieux hostiles en font des acteurs importants dans les grands cycles naturels.

CONCLUSION

Ce chapitre nous a fait passer en revue les principales recettes utilisées par les micro-organismes bactériens pour se procurer l'énergie dont ils ont besoin pour se développer. Sans cela bien des biodégradations ne pourraient avoir lieu. Les modes utilisés sont probablement très anciens et se sont perpétués dans l'évolution en conservant à la fois les mécanismes de base et la structure de maints composants. Ces mécanismes sont extraordinaires par leurs performances. Ils se montrent souvent adaptables à toute sorte de conditions. Les formidables ressources en énergie apportées par les oxydoréductions et la lumière vont actionner les transformations et biodégradations variées que nous examinerons dans les chapitres suivants.

RÉFÉRENCES

[1] SCHINK B (1997) *Microbiol. Mol. Biol.* **61** : 262-280.

[2] DIMROTH P (1982) *Eur. J. Biochem.* **121** : 443-449 ;
HILPERT W & DIMROTH P (1984) *Eur. J. Biochem.* **138** : 579-583 ;
HILPERT W & DIMROTH P (1991) *Eur. J. Biochem.* **195** : 79-86.

[3] BUCKEL W (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1505** : 15-27.

[4] GARCIA GE & STADTMAN TC (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 7080-7089 ;
GRAENTZDOERFFER A, PICH A & ANDREESEN JR (2001) *Arch. Microbiol.* **175** : 8-18.

[5] STADTMAN TC & DAVIS JN (1991) *J. Biol. Chem.* **266** : 22147-22153.

[6] DUNCAN TM, BULYGIN VV, ZHOU Y, HUTCHEON ML & CROSS RL (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95** : 10964-10968.

[7] BOYER PD, CROSS RL & MOMSEN W (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70** : 2837-2839.

[8] IKO Y, SAMBONGI Y, TANABE M, IWAMOTO-KIHARA A, SAITO K, UEDA I, WADA Y & FUTAI M (2001) *J. Biol. Chem.* **276** : 47508-47511.

[9] NOJI H, YASUDA R, YOSHIDA M & KINOSITA K (1997) *Nature* **386** : 299-302.

[10] GIRVIN ME, RASTOGI VK, ABILDGAARD F, MARKLEY JL & FILLINGHAME RH (1998) *Biochemistry* **37** : 8817-8824.

[11] RASTOGI VK & GIRVIN ME (1999) Nature **402** : 263-268.

[12] Del Rizzo PA, Bi Y, Dunn SD & Shilton BH (2002) *Biochemistry* **41** : 6875-6884.

[13] Puustinen A & Wikström M (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88** : 6122-6126 ;
Mogi T, Saiki K & Anraku Y (1994) *Molec. Microbiol.* **14** : 391-398.

[14] Takano T & Dickerson RE (1981) *J. Mol. Biol.* **153** : 79-84 et 95-115.

[15] Nar H, Messerschmidt A, Huber R, Van de Kamp M & Canters GW (1991)
J. Mol. Biol. **221** : 765-772 ;
Williams RJP (1995) *Eur. J. Biochem.* **234** : 363-381.

[16] Page MD, Sambongi Y & Ferguson SJ (1998) *Trends Biochem.Sci.* **23** : 103-108.

[17] Kranz R, Lill R, Goldman B, Bonnard G & Merchant S (1998)
Molec. Microbiol. **29** : 383-396.

[18] Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK & Iwata M (1998) *Science* **281** : 64-71 ;
Kim H, Xia D, Yu C-A, Xia J-Z, Zhang L, Yu L & Deisenhofer J (1998)
Proc. Natl. Acad. Sci. **95** : 8026-8033 ;
Hunte C, Koepe J, Lange C, Rossmanish T & Michel H (2000)
Structure with Folding & Design **8** : 669-684.

[19] Mitchell P (1976) *J. Theor. Biol.* **62** : 327-367.

[20] Snyder CH & Trumpower BL (1999) *J. Biol. Chem.* **274** : 31209-31216 ;
Snyder CH, Gutierrez-Cillos EB & Trumpower BL (2000) *J. Biol. Chem.* **275** : 13535-13541.

[21] Marsuno-Yagi A & Hatefi Y (1999) *J. Biol. Chem.* **274** : 9283-9288 ;
Marsuno-Yagi A & Hatefi Y (2001) *J. Biol. Chem.* **276** : 19006-19011.

[22] Darrouzet E, Moser CC, Dutton L & Daldal F (2001) *Trends Biochem.* Sci. **26** : 445-451.

[23] Ostermeier C, Harrenga A, Ermler U & Michel H (1997)
Proc. Natl. Acad. Sci. **94** : 10547-10553 ;
Tomizaki T & 8 auteurs (1999) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55** : 31-45 ;
Fei MJ, Yamashita E, Inoue N, Yao M, Yamaguchi H, Tsukihara T, Shinzawa-Itoh K,
Nakashima R & Yoshikawa S (2000) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56** : 529-535.

[24] Wikström M (1977) *Nature* **266** : 271-273.

[25] Babcock GT & Wikstrom M (1992) *Nature* **356** : 301-309.

[26] Michel H (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95** : 12819-12824.

[27] Kannt A, Lancaster CRD & Michel H (1998) *Biophys. J.* **74** : 708-721.

[28] Kobayashi K, Tagawa S & Mogi T (1999) *Biochemistry* **38** : 5913-5917.

[29] Matsushika A & Mizuno T (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 3973-3977.

[30] Otten MP, Van der Oost J, Reijnders WNM, Westerhoff HV, Ludwig B
& Van Spanning RJM (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 7017-7026.

[31] Otten MP, Reijnders WNM, Bedaux JJ, Westerhoff HV, Krab K, Ludwig B
& Van Spanning RJM (1999) *Eur. J. Biochem.* **261** : 767-774.

[32] Gest H & Favinger JL (1983) *Arch. Microbiol.* **136** : 11-16.

[33] Kolber ZS, Van Dover CL, Niederman RA & Falkowski PG (2000) *Nature* **407** : 177-179.

[34] Yurkov VV & Beatty JT (1998) *Microbiol. Mol. Rev.* **62** : 695-724.

[35] Ermler U, Fritzsch G, Buchanan SK & Michel H (1994) *Structure* **2** : 925-936 ;
Deisenhofer JO, Epp K, Miki R, Huber R & Michel H (1985) *Nature* **318** : 618-624.

[36] ZUBER H (1985) *Photochem. Photobiol.* **42** : 821-825.

[37] MCDERMOTT G, PRINCE SM, FREER AM, HAWTHORNETRHWAITE-LAWLESS AM, PAPIZ AZ, CGDELL RJ & ISAACS NW (1995) *Nature* **374** : 517-521.

[38] REIDL H & coll. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **725** : 455-463 ; *Biochim. Biophys. Acta* **808** : 328-333.

[39] VASSILIEVA RV, STIREWALT VM,JAKOBS CU, FRIGAARD NU, INOUE-SAKAMOTO K, BAKER MA, SOTAK A & BRYANT DA (2002) *Biochemistry* **41** : 4358-4370.

[40] ZHOU W, LOBRUTTO R, LIN S & BLANKENSHIP RE (1994) *Photosynth. Res.* **41** : 89-96.

[41] FRIGAARD NU, VOIGT GD & BRYANT DA (2002) *J. Bacteriol.* **184** : 3368-3376.

[42] HAUSKA G, SCHOEDL T, REMIGY H & TSIOTIS G (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1507** : 260-277.

[43] KANEKO T, NAKAMURA Y & 20 auteurs (2001) *DNA Res*. **8** : 205-213, 227-253.

[44] MEEKS JC & coll. (2001) *Photosynthesis Res.* **70** : 85-106.

[45] FENICAL W (1982) *Science* **215** : 923-928.

[46] RICHARDSON & CASTENHOLZ (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 2151-2158.

[47] MUR LR (1983) *Annales Microbiol.* (Paris) **134B** : 61-72 ; POST AF & coll. (1985) *FEMS Microbiol. Ecol.* **31** : 97-102.

[48] WOLK CP & SHAFFER PW (1976) *Arch. Microbiol.* **110** : 123-127.

[49] UDVARDY J & coll. (1984) *J. Bacteriol.* **157** : 681-683.

[50] THORN PM & coll. (1991) *Chem. Res. Toxicol.* **4** : 535-540 ;

[51] ANNILA A, LEHTIMÄKI J, MATTILA K, ERIKSSON JE, SIVONEN K, RANTAL TT & DRAKENBERG T (1996) *J. Biol. Chem.* **271** : 16697-16702.

[52] GLEASON FK & BAXA CA (1986) *FEMS Microbiol. Lett.* **33** : 85-88 ; GLEASON FK & CASE DE (1986) *Plant. Physiol.* **80** : 834-838.

[53] PLUDE JL & coll. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1696-1700.

[54] JORDAN P, FROMME P, WITT HT, KLUKAS O, SAENGER W & KRAUB N (2001) *Nature* **411** : 909-917.

[55] ZOUNI A, WITT H-T, KERN J, FROMME P, KRAUSS N, SAENGER W & OTH P (2001) *Nature* **409** : 739-743.

[56] RUTHERFORD AW & FALLER P (2001) *Trends Biochem. Sci.* **26** : 341-344.

[57] TANDEAU DE MARSAC N & HOUMARD J (1993) *FEMS Microbiol. Rev.* **104** : 119-190.

Chapitre 2

Génomes - Adaptations - Communications

S'adapter : c'est l'impératif essentiel de la survie dans la compétition infernale de l'environnement, où celui qui gagne est généralement celui qui va vite, ou sait faire ce que d'autres ne font pas. Pour cela il faut acquérir la bonne information génétique. Il faut aussi disposer d'un arsenal performant de protéines, se prémunir contre les agressions, réparer, se débarrasser des outils inutiles. Enfin il est profitable de s'installer aux endroits les plus favorables. La cartographie complète du génome d'un nombre grandissant de micro-organismes permet de se faire une idée précise de leur organisation génétique et de comprendre comment une population microbienne peut s'adapter rapidement par des transferts de gènes de cellule à cellule, modifier son patrimoine par des transposons et intégrons. Contrairement aux apparences, une cellule bactérienne n'est pas livrée à elle-même, mais construit avec d'autres de véritables cités qui sont les biofilms, où sa physiologie est modifiée. En outre les bactéries s'informent mutuellement de conditions particulières par des échanges de signaux chimiques.

2 – Génomes - adaptations - communications

S'adapter : c'est l'impératif essentiel de la survie dans la compétition infernale de l'environnement, où celui qui gagne est généralement celui qui va vite, ou sait faire ce que d'autres ne font pas. Pour cela il faut acquérir la bonne information génétique. Il faut aussi disposer d'un arsenal performant de protéines, se prémunir contre les agressions, réparer, se débarrasser des outils inutiles. Enfin il est profitable de se déplacer vers les endroits les plus favorables.

2.1 - La génomique des micro-organismes

Depuis quelques années, un nombre grandissant d'espèces vivantes ont vu leur génome complet séquencé, des bactéries à l'homme, en passant par la levure, des plantes et des invertébrés. Une révolution dans l'analyse génétique, une meilleure compréhension des régulations métaboliques et du développement, et pour divers procaryotes pathogènes, la nature du pouvoir infectieux. À l'origine d'une somme colossale de données obtenues sont des associations de nombreux laboratoires dans le monde. Parmi les outils de base essentiels figurent les nucléases de restriction, la constitution de banques génomiques, l'amplification par PCR, le perfectionnement des techniques d'électrophorèse et le renfort capital de l'informatique. Ces progrès sont à mettre en parallèle avec ceux de l'analyse structurale des protéines par cristallographie, RMN et maintenant spectrométrie de masse. Quelques réalisations techniques de base ont déclenché la plus grande percée des connaissances de tous les temps sur les mécanismes vitaux de base. Le but n'est pas ici d'en retracer le déroulement, mais de comprendre comment les micro-organismes ont pu évoluer de façon à s'adapter aux contingences du milieu, en particulier pour s'accommoder des différentes ressources énergétiques et nutritives qui lui sont offertes, soit à partir des constituants naturels, soit à l'aide des produits répandus artificiellement par l'activité humaine.

La taille des génomes varie énormément des animaux aux plantes et aux micro-organismes. Le génome d'un animal aussi rudimentaire qu'un nématode (*Caenorhabditis elegans*) fait plus de 100 millions de pdb avec 16384 gènes, et le génome de la petite plante *Arabidopsis thaliana* est du même ordre de grandeur, alors qu'il atteint 170 millions pour la Drosophile. Du côté des champignons, *Aspergillus niger* et *Neurospora crassa* ont des génomes de 31 et 47 millions de pdb respectivement.

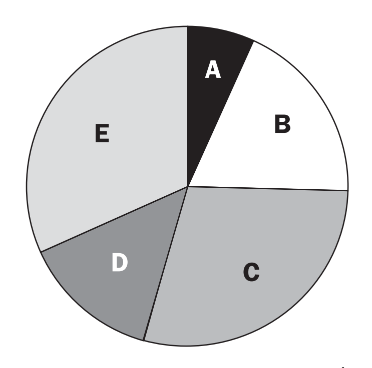
Le génome des bactéries est d'ordinaire plus petit, car son importance s'échelonne de 0,5 à près de 6 millions de pdb. La recherche s'est attaquée en priorité à des souches pathogènes, dont certaines ont un génome assez court, le plus simple étant celui du *Mycoplasma genitalium* long de 580 kb seulement. Il s'agit de comprendre comment des organismes parfois trouvés dans l'environnement banal peuvent devenir de redoutables agents infectieux. On cherche aussi à savoir par quels mécanismes les germes de l'environnement ont pu évoluer, et acquérir parfois de formidables potentialités dans le domaine des biodégradations. Les données permettent de voir qu'il y a plusieurs chemins possibles. Le tableau est une série d'exemples donnant la longueur du génome, et le nombre de gènes détectés chez la levure, une cyanobactérie, des bactéries Gram-positives (G^+) et négatives (G^-).

Génome	pdb	Gènes	Observations
Saccharomyces cerevisiae	14 213 386	6231	Eucaryote, levure de bière, bourgeonnante
Schizosaccharom. pombe	12 462 637	4929	Eucaryote, levure fissipare
Anabaena PCC 7720	6 413 771	5400	Cyanobactérie, avec 6 plasmides, de 5 à 408 kb
Pseudomonas aeruginosa	6 264 403	5570	G^-, ubiquiste, pathogène opportuniste
Ralstonia solanacearum	5 810 922	5129	G^-, en 2 parties, chromosome et grand mégaplasmide
Escherichia coli	4 639 221	4288	G^-, entérobactérie, quelquefois pathogène
Bacillus subtilis	4 214 810	4100	G^+, protéines sécrétées, métabolisme secondaire, abondant
Caulobacter crescentus	4 016 942	3767	G^-, cycle entre stade fixé et stade libre
Synechocystis PCC 6803	3 573 470	3168	Cyanobactérie, avec plusieurs plasmides
Lactococcus lactis	2 365 589	2310	G^+, lactobactérie, fermentation aéro-tolérante du lait
Neisseria meningitidis	2 272 231	1158	G^-, un agent pathogène de la méningite
Thermotoga maritima	1 860 725	1877	Thermophile primitif proche des archaebactéries
Streptococcus pyogenes	1 852 442	1752	G^+, pathogène, plus de 40 gènes de virulence
Haemophilus influenzae	1 830 137	1703	G^-, pathogène occasionnel, transformable
M. thermoautotrophicum [1]	1 751 377	1855	Archaebactérie méthanogène thermophile
Treponema pallidum	1 138 006	1041	G^-, spirochète agent de la syphillis
Chlamydia trachomatis	1 042 519	894	G^- agent du trachome, proche des rickettsies
Mycoplasma genitalium	580 070	470	G^-, répandus, parasites intracellulaires, sans paroi

Comment dénombrer les gènes dans la séquence ? La démarche procède de l'identification des *ORFs**. En principe chaque ORF représente une protéine ou une des

1 - *Methanobacterium autotrophicum.*

sous-unités d'une protéine si celle-ci a une structure quaternaire dotée de polypeptides différents. La totalité de ces ORF ne représente pas toute la longueur du génome, car il existe des sections non transcrites. Ce sont des promoteurs, ou des séquences codant pour des fonctions régulatrices sur l'expression des autres parties, ou encore des séquences codant pour des ARNr et des ARNt. *Pseudomonas aeruginosa* possède un génome relativement volumineux, et la répartition des ORF répond à un diagramme qui résume quelques interprétations **[1]** :



A - gènes dont la fonction est démontrée

B - gènes homologues de gènes dont on connaît la fonction dans d'autres organismes

C - gènes dont la fonction réelle est rendue probable par des homologies limitées

D - gènes homologues d'autres gènes dont on ignore la fonction

E - gènes sans homologies trouvées dans les bases de données, fonction inconnue

Affectation des gènes chez Pseudomonas aeruginosa

On voit que l'affectation des gènes reconnus dans la séquence n'est déterminée que pour un quart des ORF, dont moins de 7% avec certitude (par mutations, comparaison avec la séquence d'acides aminés de la protéine, etc.). La proportion des gènes auxquels on peut attribuer une fonction est de 54%. Comme d'autres espèces classées dans le groupe des *Pseudomonas*, ce germe bactérien a un pouvoir d'adaptation exceptionnel. Il habite les sols, marais et milieux littoraux, peut dégrader une foule de composés (phénols, hydrocarbures, halodérivés), résiste à un série d'antibiotiques et de désinfectants, se développe sur les plantes, forme volontiers des biofilms (section 8), et se comporte comme un pathogène opportuniste tous azimuts, en particulier pour l'homme où il est responsable d'infections graves chez les blessés et en milieu hospitalier. Un très gros palmarès ! Le métabolisme cellulaire de base met en jeu environ 750 gènes, dont 119 pour fabriquer des cofacteurs et transporteurs. Le plus remarquable est l'importance du matériel génétique consacré aux protéines régulatrices, soit 403 gènes reconnus. Cette valeur élevée accompagne logiquement le grand pouvoir d'adaptation à des conditions variées. À cela s'ajoutent les *systèmes de régulation à deux composants** qui sont actionnés par 118 gènes supplémentaires. À l'autre extrémité de l'échelle, les génomes les plus simples, comme ceux des mycoplasmes, accompagnent des espèces parasites, qui n'ont pas besoin d'une chimie de synthèse aussi compliquée puisque la plupart des éléments sont soutirés de la cellule hôte **[2]**.

Comment les espèces ont-elles pu évoluer pour s'adapter à un changement de milieu ? On possède des éléments de réponse en ce qui concerne les bactéries grâce aux données de la génomique. Des bactéries à grand pouvoir d'adaptation comme les *Pseudomonas* et le colibacille ont de nombreux gènes concernant des fonctions régulatrices, des mécanismes de réparation et de recombinaison, ainsi

que de nombreux facteurs anti-stress. Les mutations elles-mêmes sont régulées. Une très longue sélection s'exerce au sein des populations pour faire émerger peu à peu les lignées les mieux adaptées alors que l'environnement est très riche en antibiotiques[2] et en substances organiques de défense d'origine végétale. Les bactéries s'adaptent par sélection, par régulations poussées, parfois par une certaine redondance dans leur arsenal enzymatique. Un intérêt considérable est soulevé par l'étude des micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles. Ce sont généralement des archaebactéries et des formes bactériennes primitives qui ont conservé un souvenir de leur parenté avec les archaebactéries. Les thermophiles n'ont pas qu'un intérêt purement académique, car on recherche des enzymes thermostables et des espèces pouvant faire des biodégradations à température élevée. Un thermophile célèbre est *Thermus aquaticus*, qui a permis la mise au point de départ de la méthode PCR. *Thermotoga maritima* et un *Aquifex aeolicus* sont des habitants des sources chaudes et sont connus comme des représentants particulièrement primitifs du groupe des bactéries sur la base de leur ARN 16S. Leurs génomes ont été séquencés et révèlent une parenté avec les archaebactéries. Les génomes archaebactériens déjà séquencés sont l'objet d'une grande curiosité car on peut y déceler des ressemblances avec les autres grandes divisions du monde vivant. Les archaebactéries constituent un vaste groupe qui a buissonné énormément au cours de l'évolution. Près de la moitié des gènes ont une ressemblance de séquence avec ceux des protéobactéries, et 10-15% ont manifestement des affinités avec des gènes de type eucaryote. Dans le premier cas, les analogies se trouvent principalement dans les gènes de la synthèse de cofacteurs et de petites molécules, d'enzymes du métabolisme intermédiaire, de transporteurs, de protéines régulatrices et des enzymes de fixation de l'azote. Dans le second cas, les ressemblances concernent le métabolisme de l'ADN, la cription et la traduction sur les ribosomes, sans oublier des ATPases. Ces indices ont fait supposer que les premières cellules d'eucaryotes étaient des organismes ancêtres des archaebactéries actuelles. Elles auraient acquis secondairement par endosymbiose les organismes précurseurs des mitochondries et des plastes.

L'acquisition en bloc de gènes étrangers est la voie d'adaptation des gens pressés. Il s'agit d'acquérir d'un seul coup une information génétique extérieure par ce qu'on appel un transfert horizontal, autorisant une adaptation précipitée sans attendre le hasard des mutations. Les acquisitions peuvent être compensées par des éliminations, qui font que le génome n'augmentera pas nécessairement dans des proportions démesurées. Les bactéries ont trois modes d'acquisition de ce type : une transformation, un échange de plasmide, une infection virale. Le côté remarquable de l'accumulation des séquences génomiques est de permettre la détection des traces laissées par les différents apports, parfois anciens, à tel point qu'on a pu parler d'une "archéologie" du génome. Elle se fonde sur l'examen de la composition en bases, l'usage des codons, la présence de séquences homologues avec d'autres espèces, des séquences d'insertion, des traces de prophages…

---

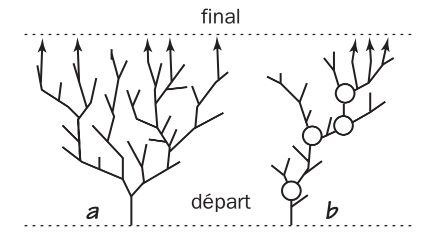
2 - *Les antibiotiques utilisés en thérapeutique ne représentent qu'un pourcentage très faible parmi ceux qui ont été découverts.*

Nous en citerons des exemples. Ces phénomènes sont particulièrement fréquents chez les pathogènes, mais existent aussi chez les bactéries capables de faire des biodégradations. L'apport de voies métaboliques entières n'y est sans doute pas exceptionnel.

Peut-on reproduire artificiellement l'évolution au sein d'une même espèce ? Le problème pourrait paraître a priori saugrenu, car l'évolution est un processus extrêmement lent. Pourtant les bactéries offrent un terrain d'étude favorable à cause de la brièveté de leur temps de génération. Une constatation remarquable a été faite. Elles savent gérer le taux des changements dans leur patrimoine génétique. Le choix expérimental s'est porté sur *Escherichia coli*, car c'est l'espèce dont on connaît le mieux la physiologie et la génétique. Elle a cependant l'inconvénient d'être relativement spécialisée, et on peut craindre que les données ne soient pas automatiquement généralisables aux autres espèces. Le principe expérimental de départ est très simple. Une souche de *E. coli* génétiquement homogène et asexuée (un clone) est cultivée sur un milieu défini aussi simple que possible : du glucose dans un mélange salin. Les bactéries sont cultivées en milieu liquide et repiquées périodiquement en diluant chaque fois un échantillon de la culture dans du milieu frais, et ainsi de suite des milliers de fois. L'expérience a été faite sur plusieurs années et sur 12 lignées différentes. Plus de 20.000 générations ont ainsi été obtenues. Comme les bactéries ont eu l'occasion de se multiplier abondamment avant chaque transfert, c'est en fait un très grand nombre de divisions qu'elles ont subi. Des échantillons sont examinés pour la dérive de leurs propriétés et les changements de leur appareil génétique. Une façon d'observer l'évolution en chambre et en raccourci.

La difficulté de cette expérimentation vient de la méthode de mesure. Beaucoup de mutations ponctuelles sont "silencieuses", c'est-à-dire qu'elles n'amènent aucun changement phénotypique et ne seraient détectables que par un séquençage prohibitif. L'absence d'effet immédiat d'une mutation peut survenir à deux niveaux. Le premier est le passage d'un triplet de bases ou codon à un autre de même signification, par exemple le changement de CUG en CUA, ces deux codons étant pour la leucine. Le plus souvent les mutations de ce type portent sur la troisième base d'un triplet pour donner un synonyme. Le deuxième niveau est plus complexe, car il concerne l'activité biologique et la stabilité du polypeptide formé. Certains remplacements d'un acide aminé par un autre dans une protéine restent neutres. D'autres entraînent un changement de propriétés ou même l'inactivation du produit. Il existe bien entendu d'autres types de *mutations**, et les changements ont d'autant plus de chance de créer des perturbations immédiates dans la descendance, voire être létales, qu'ils sont plus importants ou concernent des zones sensibles. Dans une lignée bactérienne ne recevant aucune information de l'extérieur (ni virus, ni transformations, ni plasmides), on peut mesurer l'accumulation des mutations par la disparition de certaines voies métaboliques. La méthode de COOPER et LENSKI consiste à analyser le pouvoir du colibacille à croître sur différentes sources carbonées au cours de son évolution **[3]**, les tests étant faits

sur des galeries Biolog[3]. Au fil des nombreux transferts, les lignées étudiées cultivées sur glucose perdent peu à peu toute une série de propriétés. Cette dégradation apparente s'accompagne-t-elle d'une perte de compétitivité ? Pas forcément. Une amélioration des performances par rapport à la souche mère semble se dessiner.



Les deux schémas simplifiés symbolisent l'évolution d'une population dans deux cas extrêmes. Les segments représentent les sous-populations au cours du temps. Chaque embranchement est une mutation. En *a*, la pression sélective est faible ou inexistante, la population se diversifie en rameaux buissonnants. En *b*, une pression sélective s'exerce à chaque mutation et donne la prépondérance à une lignée. Au cours de chaque évolution, des rameaux viennent à extinction face à la concurrence exercée au sein des populations. En *b* l'arbre évolutif passe par plusieurs goulots d'étranglement, figurés par les cercles aux embranchements. Les populations finales observées dérivent d'une série d'ancêtres successifs communs. Il va sans dire que l'évolution au sein du règne animal et chez les eucaryotes en général pose des problèmes sans commune mesure avec celle d'une population bactérienne de laboratoire. Les échanges sexuels, changements du milieu, épidémies et migrations apportent autant de facteurs supplémentaires. Une conclusion intéressante faite à la suite des cultures à long terme du colibacille est l'influence bénéfique que peut avoir l'abandon de certaines voies métaboliques. Cette disparition intervient tôt dans ces expériences et s'accompagne d'un rythme accéléré des mutations. En somme les bactéries, quand elles se débarrassent des voies inutiles, ne s'en portent que mieux après avoir trouvé par chance les bons numéros. Où les mutations se produisent-elles et quand ? Une autre voie d'approche utilisant aussi les nombreuses générations successives du colibacille consiste à fragmenter le génome par des nucléases de restriction. Dans le chromosome de *E. coli* sont dispersées des séquences spéciales en exemplaires multiples (1-10 et davantage) appelées **séquences d'insertion** ou **IS**, examinées plus loin dans ce chapitre. Ces IS servent ici de marqueurs **[4].** Quand le génome a été découpé en fragments par une nucléase de restriction qui les laisse toutes intactes, on peut repérer les morceaux porteurs de ces IS. Le repérage se fait par hybridation par une sonde spécifique pour chaque IS. Par exemple la présence dans la population des morceaux contenant une séquence IS3 sera identifiée après dénaturation[4], électrophorèse et récupération sur filtre (voir *Southern**). Une sonde nucléique appropriée pourra s'hybrider avec IS3 et révéler sa présence. On obtient ainsi une sorte d'empreinte digitale spécifique. Toute mutation qui dérange le découpage initial par la nucléase, par exemple une délétion ou une inversion, se traduit par une modification de l'empreinte. Les tests utilisant plusieurs nucléases de restriction et les sondes spécifiques des divers IS permettent de se faire une idée, après analyse

---

3 - Faites sur le même principe que les galeries API System de Biomérieux, comme API 50.

4 - Transformation de l'ADN bicaténaire en ADN à un brin.

statistique, de la pluralité de ces mutations et de leur importance au cours du temps. La présence des IS est d'ailleurs responsable d'une partie des variations constatées, et nous verrons ultérieurement pourquoi.

Les expériences d'évolution en chambre ont toutes montré que le génome bactérien était extraordinairement plastique en absence de tout élément génétique étranger. À la base est la compétitivité des cellules et leur évolution par sélection. On même se demander pourquoi le génome n'évolue pas plus vite et pourquoi les mutations ne sont pas plus nombreuses. Or l'intégrité du génome, en l'occurrence de l'ADN, est surveilée constamment dans la cellule par diverses protéines, les erreurs éventuelles, qui se traduisent généralement par la perte d'une base ou un défaut d'appariement au cours de la réplication, étant réparées par des systèmes complexes. L'exactitude des copies est tout aussi importante dans nos ordinateurs quand nous enregistrons ou recopions un fichier ! On citera seulement deux types de lésion dans l'ADN. La première est d'ordre chimique, la plus classique étant l'action photochimique de l'ultraviolet. Cette lésion déclenche notamment l'induction d'un système de réparation qu'on appelle la ***réponse SOS****. Elle induit l'expression de nombreux gènes qui consistent à réparer un défaut dans un brin d'ADN, à exciser la partie malade et à refaire la partie manquante.

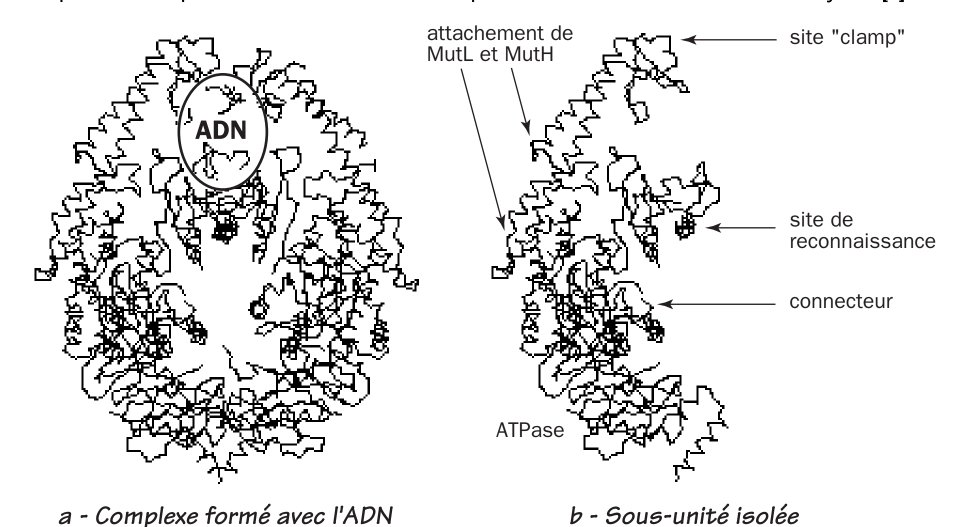
Les bactéries ont plusieurs systèmes de réparation qui se complètent et mettent en commun certains facteurs. Un cas particulièrement intéressant est celui des protéines **MutS**, **MutL** et **MutH**. Nous nous limiterons ici à cet exemple. Ces protéines sont chargées de corriger une erreur de réplication, là où une base erronée aurait été placée en face du modèle. Par exemple A en face de C au lieu de G. La protéine MutS reconnaît le défaut d'appariement, active MutH qui est une endonucléale et MutL qui décide sur quel brin aura lieu la réparation. Cette détection suivie de réparation n'a pas lieu n'importe quand. Elle survient de préférence après le passage de la fourche de réplication, où le brin d'ADN nouveau est apparié au brin parental par une exacte complémentarité. Si un défaut survient, le système Mut doit être capable de reconnaître le nouveau et l'ancien, puisqu'il s'agit de remplacer une base qui n'est pas à sa place. Si l'enzyme se "trompait", elle provoquerait un changement dans le brin parental et serait cause d'une mutation. Comment les deux brins sont-ils distingués ? Par le **système Dam**. Il est fondé sur la présence de nombreux motifs GATC, échelonnés le long de l'ADN. Cette petite séquence est symétrique, elle se lit dans les deux sens. Chaque site GATC se présente au même niveau sur les deux brins d'ADN. Il est la cible d'une méthylase, codée par le gène *dam*, qui méthyle l'adénine à ces positions. Quelle est la signification de cette opération ? Quand la réplication de l'ADN dépasse ce motif, il y a séparation des brins parentaux qui emmènent chacun leurs sites GATC méthylés. Le passage de la fourche de réplication fait donc apparaître des motifs *dam* nouveaux, qui n'ont pas encore eu le temps de se faire méthyler. Ils le seront au bout de quelques minutes mais la présence d'adénine non méthylée est un signal qui veut dire que la réplication vient d'avoir lieu à cet endroit.

5' GATC 3'
3' CTAG 5'
site *dam*
doublement méthylé

5' 3'
*A T A G C T G C
C G A T A G C T A C *
site *dam*
temporairement hémiméthylé

Régulation par méthylation

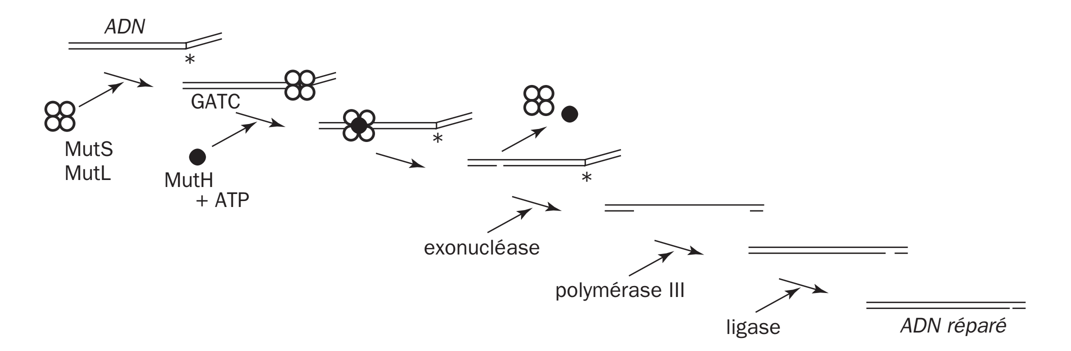
Un site GATC non méthylé sert de motif de reconnaissance à MutS pour distinguer le brin nouveau du brin parental. Les défauts que MutS est chargée de détecter ne se trouvent pas nécessairement au voisinage immédiat. MutS est une protéine dimère dotée d'une structure flexible. Elle fait plusieurs choses : se lier à l'ADN, reconnaître un défaut, lier et hydrolyser de l'ATP, puis après avoir rencontré un défaut, lier l'**ATPase MutL**, et l'**endonucléase MutH**. C'est une mécanique moléculaire très intéressante car on connaît la structure de ces différentes protéines. **MutS** (2 × 811 résidus) a une affinité naturelle pour l'ADN, mais cette affinité devient 20 fois plus forte quand elle rencontre un défaut **qui se traduit par une déformation de la double hélice d'ADN.** MutS est le détecteur. La protéine est en même temps une ATPase. La rencontre d'un défaut lui fait lier de l'ATP. Elle subit un changement de conformation qui lui permet de se cramponner à l'ADN et de coulisser sur sa longueur, tout en hydrolysant de l'ATP. On pense que cette consommation d'énergie sert de moteur à ce déplacement de la protéine, mais le mécanisme exact est encore débattu. MutS est donc une protéine qui patrouille la longueur de l'ADN jusqu'à ce qu'elle rencontre un défaut. Ces mouvements moléculaires nécessitent de l'énergie apportée par l'ATP. La structure détaillée de MutS a été publiée et permet de se rendre compte du fonctionnement de l'enzyme **[5]**.



a - Complexe formé avec l'ADN ***b - Sous-unité isolée***

MutS sur l'ADN

Les deux sous-unités de la protéine sont vues sur le schéma structural *a* en direction de l'axe de l'ADN. Elles sont emboîtées de façon légèrement dissymétrique là où l'ADN présente une distorsion structurale due à une base non appariée. La protéine s'accroche à l'ADN par des portions flexibles formant le "clamp", indiqué sur la structure d'une sous-unité en *b*. Il y a un site pour l'ATP par sous-unité dans une région où les deux parties sont en contact, et la partie appelée connecteur jouerait le rôle de courroie de transmission entre les deux extrémités. La réparation fonctionnerait comme ceci. La liaison de MutS avec une anomalie sur l'ADN localement tordu déclencherait un changement conformationnel autorisant la liaison avec l'ATP. Une protéine partenaire qui est elle-même une ATPase, **MutL**, serait alors activée **[6]** en venant s'accoler à MutS et stabiliserait son attachement à l'ADN. Elle est accompagnée du troisième larron **[7]**, **MutH**. Le complexe formé, MutS-MutL-MutH se déplacerait dans un sens ou dans l'autre le long de l'ADN, jusqu'à rencontrer une séquence GATC dont il a été question plus haut. Si le site contient un GATC non méthylé, celui-ci est coupé par l'endonucléase H. D'autres protéines vont alors parachever le travail. Une hélicase débobine l'ADN coupé sur un brin, en direction de la zone malade, des exonucléases décapent toute cette partie et même un peu au-delà. Une nouvelle synthèse réparatrice par la polymérase III a lieu, et la ligase fait la soudure.

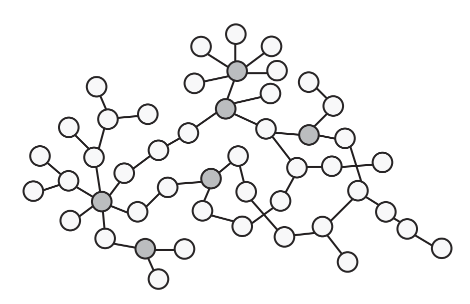


Les bactéries mutées dans leur gène *mutS* restent viables, mais présentent un taux de mutation accru. Ce système à un rôle majeur dans la réparation des erreurs de réplication chez *E. coli*, mais n'est certainement pas spécifique à cette espèce. MutS est le chef de file d'une famille structurale de protéines répandue chez les procaryotes et les eucaryotes et toutes les espèces vivantes pourraient réparer leur ADN sur un principe similaire. Les rares mutations qui échapent à la réparation ont une fonction utile. Elle est sans conséquence dans une population de milliards d'individus et le mutant a toute chance d'être éliminé. Mais si une mutation tire le bon numéro, celui qui va lui permettre par exemple de dégrader un produit nouveau du milieu, l'avantage sélectif sera tel que le mutant inondera rapidement de sa descendance la population, et ce sera un facteur d'adaptation considérable de celle-ci.

2.2 - PROTÉOMIQUE ET COMPLEXES MULTI-PROTÉIQUES

Alors que la liste des génomes complètement séquencés ne cesse de s'allonger pour atteindre la centaine, des avancées considérables ont eu lieu dans la protéomique, qui est l'étude des protéines d'un organisme dans leur ensemble, ainsi que l'examen de toutes les interactions qu'elles présentent entre elles. Chaque protéine n'est pas une pièce isolée travaillant pour son propre compte dans le contexte cellulaire, mais peut s'associer de façon temporaire ou permanente à d'autres en formant des unités fonctionnelles plurivalentes, pouvant par exemple catalyser, lorsque chaque partenaire est une enzyme, une succession de réactions métaboliques dans le même métabolisme. L'existence de complexes multi-enzymatiques a été reconnue depuis longtemps. Dans les cas les plus sophistiqués s'observent des protéines à haute masse moléculaire dont les chaînes sont formées de plusieurs domaines, chacun d'eux renfermant un site catalytique distinct. Un exemple classique est le complexe de synthèse des acides gras saturés chez la levure et les mammifères, où 7 réactions catalysées soit autant de sites enzymatiques sont regroupés dans une même macromolécule. Dans d'autres cas l'association est non covalente. Deux protéines peuvent s'associer ainsi à la faveur d'un équilibre entre le complexe formé et les entités séparées. La formation du complexe est favorisée en milieu concentré comme celui du cytoplasme cellulaire. La dilution encourage au contraire la séparation, comme dans les manœuvres d'extraction et de purification courantes. C'est pourquoi beaucoup d'associations sont perdues dans l'expérimentation habituelle.

La preuve de l'existence du complexe repose généralement sur l'apparition d'une propriété nouvelle que les protéines n'ont pas lorsqu'elles ne sont pas associées. L'analyse biochimique de ces problèmes est souvent laborieuse, la sélection des mutants génétiques appropriés n'est pas toujours facile ni même réalisable. Un grand progrès a été réalisé sur la levure. Son génome contient plus de 6000 gènes. Le but est de rechercher les relations spécifiques entre protéines, par des contacts qui ne se font pas au hasard mais impliquent une connection à la fois structurale et fonctionnelle. L'idée est symbolisée par un dessin en forme de diagramme. Certaines protéines fonctionnent en solitaire, d'autres, en majorité, sont reliées fonctionnellement à 3,4 partenaires et même davantage. La conséquence est très importante. La dotation de la cellule en protéines, son protéome, apparaît comme un énorme réseau où certaines protéines occupent des nœuds, et ont probablement une importance critique. Comme par hasard, toute mutation concernant l'un de ces nœuds risque d'avoir des incidences beaucoup plus graves que les mutations touchant les protéines périphériques par rapport au réseau. On a même comparé le principe de ces réseaux à la carte d'Internet.



Conséquences immédiates : chaque mutation sur l'un des nœuds risque d'être létale pour la cellule (cercles foncés), et le taux d'évolution des protéines correspondantes sera beaucoup plus lent que pour les autres. Comme une mutation à leur niveau a une probabilité très grande de léser une ou plusieurs relations essentielles, le conservatisme de leur séquence et de leur structure n'en sera que plus marqué.

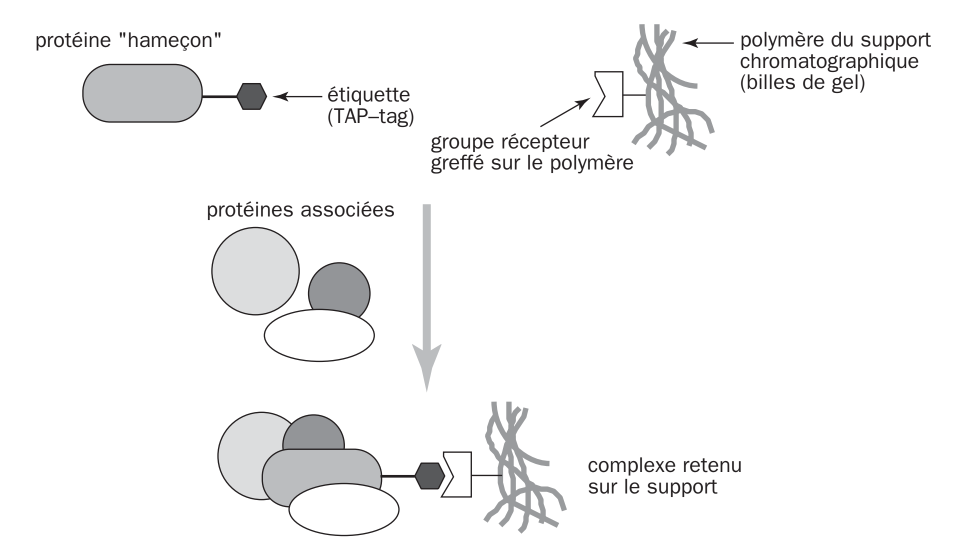
La tâche de détecter les interactions au sein d'un très grand nombre de produits serait paru à première vue insurmontable. Peter UETZ et coll. **[8]** ont obtenu environ 6000 transformants de levure par insertion d'un nombre équivalent de gènes ou d'ORF, soit des échantillons de la quasi-totalité du génome. La technique de base utilisée est celle des ***doubles hybrides****. Son principe est sommairement expliqué en glossaire avec un croquis explicatif. Une levure recombinante est capable d'exprimer la β-galactosidase du colibacille[5] à condition de posséder un activateur de transcription appelé GAL*4*. Ce facteur permet l'amorçage de la transcription grâce à deux domaines structuraux, l'un qui interagit avec l'ARN-polymérase, l'autre qui se lie à l'ADN.

GAL*1-LacZ* est un gène recombiné artificiellement dont l'expression se traduit par des colonies de couleur bleue sur les boîtes de milieu, alors que les autres restent blanches. Pour que la transcription ait lieu, il faut que l'ARN-polymérase s'installe en amont sur le site promoteur. Elle peut le faire avec l'aide de l'activateur GAL*4* constitué de plusieurs domaines, qui s'attache en amont sur *l'ADN sur un site UAS**. L'idée est de remplacer cet activateur par deux protéines, l'une contenant le domaine chargé de se lier à l'ADN et soudé à une protéine X, l'autre contenant le domaine activateur soudé à une protéine Y. Lorsque X et Y peuvent s'associer ensemble parce qu'elles ont une affinité l'une pour l'autre, elles remplacent toute la partie centrale de l'activateur. La protéine chimérique ainsi reconstituée peut jouer le rôle d'activateur de transcription. Le criblage de toutes les combinaisons possibles (un énorme travail fait par des techniques expérimentales automatisées) a permis de détecter les protéines qui peuvent s'apparier ainsi et d'en faire un catalogue. Bien souvent, une interprétation logique de ces associations est possible quand elles concernent deux enzymes impliquées dans un même métabolisme. Dans d'autres cas, il peut s'agir d'éléments de fonction inconnue, qu'on peut deviner cependant si on connaît l'une des protéines partenaires. Au total 957 interactions ont été détectées impliquant plus de mille protéines ! Ainsi se dégage peu à peu l'énorme architecture en réseau, où certaines protéines occupent les nœuds d'un vaste filet. La grande question est de savoir si l'agencement général est plus ou moins conservé d'un organisme à l'autre, et l'avenir nous l'apprendra. On comprend mieux pourquoi certaines protéines sont affectées d'un grand conservatisme, des bactéries à la levure et à l'homme. Elles occupent les "nœuds" associant plusieurs partenaires. Toute modification de l'une des protéines concernées devrait s'accompagner de changements parallèles et conformes dans les autres protéines, ce qui est très peu probable statistiquement.

---

5 - *La synthèse de l'enzyme se traduit par un test très simple sur boîte, donne des colonies bleues, les autres restant blanches.*

D'autres méthodologies sont basées sur la **spectrométrie de masse**. Là encore sont testées en nombre énorme par un criblage en partie robotisé les différentes combinaisons possibles. Voici le principe. On veut savoir avec quelles protéines de la levure un des composants peut s'associer. On va se servir de celui-ci comme hameçon. Dans un premier temps, on allonge légèrement sa séquence par recombinaison génétique de façon à lui faire porter un fragment qui sera reconnu spécifiquement par un *gel d'affinité** (voir *chromatographie d'affinité**). C'est la méthode du ***TAP-tag**** **[9]**. La protéine, sur laquelle a été soudé une "étiquette" par une partie flexible, est retenue sur gel chromatographique. Si cette protéine est associée à des partenaires, c'est tout le complexe qui est fixé avec toutes ses composantes. Il s'agit donc ensuite de récupérer le complexe par coupure enzymatique du bras flexible porteur de l'étiquette, de le dissocier et d'en repérer les morceaux séparés par une électrophorèse. L'identification des fragments un à un se fait par spectrométrie de masse **[10]**.

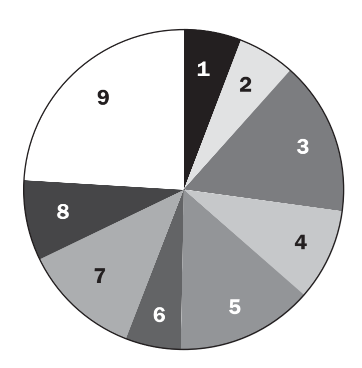


Piégeage des associations

Cet énorme travail de criblage a porté sur 1739 gènes, identifiés par leur séquence et leur homologie avec des gènes connus chez d'autres espèces dont l'homme. Les grands progrès faits dans la spectrométrie de masse des protéines depuis une quinzaine d'années ont facilité le séquençage et l'identification de tous les peptides en s'appuyant sur des analyses automatisées[6]. Plus de 200 complexes ont été identifiés, avec une taille allant de 2 à 83 composants reliés à une même protéine, la moyenne étant de 12. Plus de la moitié des complexes avaient au plus 5 protéines. De façon générale les regroupements concernaient tous les grands secteurs de l'économie cellulaire comme l'indique le diagramme.

---

6 - *Les peptides sont découpés en fragments définis, la spectrométrie de masse permet de reconstituer leur séquence acide aminé par acide aminé, et les résultats sont analysés par ordinateur.*



1 - Cycle cellulaire
2 - Polarité cellulaire et structure
3 - Métabolisme intermédiaire et énergétique
4 - Synthèse et renouvellement des membranes
5 - Synthèse des protéines
6 - Transport (ARN, protéines)
7 - Métabolisme de l'ARN
8 - Régulations
9 - Transcription, réparation d'ADN, chromatine

Distribution par fonction des complexes de la levure

Les amas de protéines contractant des associations entre elles sont détectés par les techniques citées, mais ne sont probablement pas des groupes étanches juxtaposés les uns aux autres. Au contraire les communications entre groupes sont visibles quand une même protéine se retrouve associée à plusieurs d'entre eux. Ainsi les protéines régulatrices semblent avoir une répartition complexe. Nous avons bien la notion d'un véritable et immense réseau, comme cité antérieurement, dont toutes les mailles ne sont pas nécessairement connues. Les connections entre les groupes sont considérables. En outre cette volumineuse analyse a permis de déterminer la fonction hautement probable de gènes dont on ignorait totalement l'identité. D'autres auteurs ont mis en évidence de nombreux complexes multi-protéiques chez la levure par immunoprécipitation et spectrométrie de masse **[11]**. Ils ont détecté environ 3600 associations couvrant le quart du protéome de levure. Des observations passionnantes permettent de comparer cette extraordinaire répartition avec le génome humain. Les protéines ayant leurs équivalents orthologues chez l'homme (par comparaison des séquences et fonctions) sont précisément celles qui contractent le plus grand nombre d'associations, et dont l'importance stratégique pour la vie cellulaire est probablement la plus grande.

L'existence des énormes réseaux de la protéomique n'exclut pas les apports génétiques extérieurs. L'entrée d'un plasmide porteur de tous les gènes d'une voie métabolique, par exemple celle qui permet le dégradation du toluène, ne fait que surajouter des protéines nouvelles dont l'intégration au réseau existant n'est sans doute pas nécessaire.

Le véritable nombre des interactions entre protéines chez la levure atteindrait au moins 30 000. Malgré ces avancées remarquables, des réserves prudentes doivent être émises. Les auteurs reconnaissent l'existence d'un bruit de fond non spécifique qui ferait apparaître de fausses interactions. D'autres cas démontrés par les méthodes traditionnelles ne sont pas détectés. La précision est donc loin d'être absolue, mais les perspectives sont très grandes. Ce volet de la recherche a permis de remettre au premier plan une notion banale, qui est celle de la forte concentration des macromolécules dans une cellule vivante. En fait les enzymes et autres facteurs qui actionnent la chimie cellulaire fonctionnent dans une purée organique concentrée qui limite les diffusions et modifie les cinétiques réactionnelles. On estime que la concentration des protéines et acides nucléiques dans

une cellule de colibacille équivaut à 300-400 g/L. C'est énorme par rapport aux conditions habituelles de laboratoire, où ces macromolécules sont manipulées à des concentrations 100 à 500 fois plus faibles ! Or les hautes concentrations intracellulaires ont plusieurs répercussions. Les conditions sont très éloignées des solutions idéales examinées généralement en thermodynamique des équilibres. Dans un entassement de macromolécules se produit un effet d'exclusion du solvant conduisant à une augmentation des activités d'un facteur d'autant plus considérable que les masses moléculaires sont plus élevées et l'exclusion du solvant plus marquée. L'encombrement du milieu déplace les constantes d'équilibre des associations-dissociations. Il en résulte qu'en milieu hyperconcentré les associations entre protéines sont favorisées, ainsi que les dimérisations, oligomérisations. Le système tendra à évoluer dans le sens qui diminue l'influence du solvant, rend les protéines plus compactes, favorise leur repliment et facilite les associations. La stabilité des protéines tend à augmenter. Enfin les effets cinétiques sur les réactions sont complexes, car l'augmentation d'activité tend à les accélérer, tandis que les diffusions de substrats sont entravées. On admet qu'il existe un optimum, celui-ci est difficile à déterminer expérimentalement[7]. En somme la réactivité intracellulaire des protéines peut être beaucoup plus élevée que celle qu'on mesure habituellement dans le tube à essai.

Ces aspects importants sont discutés dans un article de R.J ELLIS **[12]**. Ils laissent les biochimistes réaliser que pendant longtemps ils ont pu faire fausse route, en étudiant les protéines dans des conditions éloignées de leur cadre naturel. Les avancées de la protéomique et la découverte des nombreuses associations spécifiques entre protéines jettent une lumière nouvelle sur ces problèmes.

2.3 - TRANSFERTS GÉNÉTIQUES HORIZONTAUX

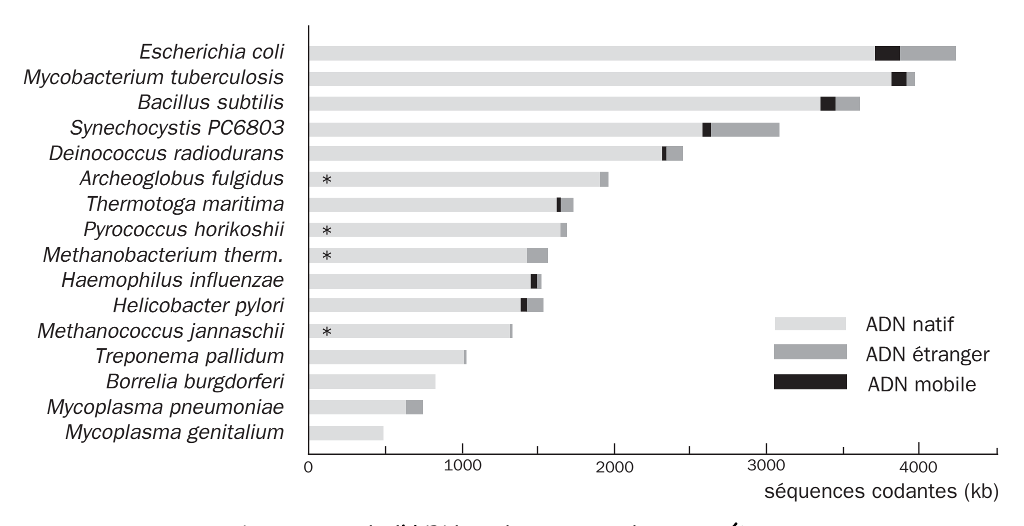
Les cellules de micro-organismes ne sont pas des boîtes étanches à tout échange d'information génétique, qui transmetterait à leur descendance une bibliothèque inviolable de gènes. Les transferts génétiques horizontaux mettent en jeu des échanges de cellule à cellule. Le phénomène s'est certainement produit sur une vaste échelle au cours de l'évolution. Des échanges considérables ont eu lieu également au sein des cellules des eucaryotes entre l'ADN de leurs plastes, de leurs mitochondries et du noyau. Dans les bactéries du sol et des milieux aquatiques, il est devenu évident que l'acquisition en bloc de nouvelles propriétés était possible, venant augmenter les capacités d'adaptation et de biodégradation des diverses lignées. L'acquisition horizontale d'information génétique a notamment attiré l'attention par la prolifération de germes pathogènes qui présentaient des résistances multiples aux antibiotiques. Il est devenu évident que l'acquisition rapide et simultanée de multiples facteurs ne pouvait pas se faire par le jeu de

---

7 - On peut imiter ces conditions dans des solutions de protéines in vitro en ajoutant des "crowding agents", macromolécules provoquant l'effet d'exclusion : polyéthylènes glycols, Ficoll, albumine.

mutations ordinaires survenues au hasard, mais correspondait à l'acquisition globale de segments génétiques importants maintenus dans la descendance par un avantage sélectif **[13]**.

Comment se rendre compte de l'étendue de ces transferts ? Un outil capital est l'observation des séquences. L'apport d'ADN se fait principalement par plasmides et transposons, dont les caractères seront revus plus loin. Les génomes bactériens présentent des longueurs très inégales. Le diagramme suivant compare les dimensions de quelques génomes entièrement séquencés **[14]**. Les astérisques notent des archaebactéries. On peut voir la petite proportion des gènes extérieurs sous forme d'ADN étranger (surtout plasmidique) ou d'ADN mobile (transposons) intégré au génome principal.



Longueur de l'ADN codant pour des protéines

Cette figure reprise et modifiée de l'article de Ochman et coll., ne peut pas donner une vision moyenne de l'ensemble des espèces bactériennes. Les efforts de séquençage ont porté en priorité sur les espèces dont on connaissait bien la génétique (le colibacille), qui avaient des génomes courts (mycoplasmes), qui vivaient dans des environnements exceptionnels (thermophiles) ou qui étaient pathogènes (tréponèmes). On peut voir malgré tout que les transferts horizontaux reconnus comme évidents ne sont pas rares. Divers auteurs admettent que, dans le chromosome du colibacille, ils atteignent au minimum 10 à 16%. Les apports extérieurs les plus visibles sont les plus récents. Une souche bénigne d'*Escherichia coli* s'est transformée en pathogène dangereux par l'acquisition en une seule fois d'un îlot de pathogénécité appelé ***Pais****. De même l'acquisition des résistances multiples est considérée depuis longtemps comme l'entrée de séquences entières plutôt qu'une série de mutations ponctuelles affectant des gènes préexistants. Le génome complet du colibacille MG1655 contient 4 639 221 pdb **[15]**, et a été passé au crible pour détecter des séquences exogènes, en utilisant une analyse statistique recherchant les déviations en contenu *G + C** et dans l'emploi des codons **[16]**. L'analyse suggère que 755 cadres de lecture (ORF) sur 4288 sont d'origine

externe, ce qui représente un total de 548 kb répartis sur tout le chromosome. Ces insertions se seraient produites un grand nombre de fois au cours de l'évolution, et leur détection ne représente peut-être que la partie émergée de l'iceberg, parce que les apports les plus anciens auraient vu leurs particularités effacées.

Différentes constatations ont donné lieu à spéculation sur l'histoire du génome de *E. coli*. Par exemple, bon nombre d'insertions semblent avoir été réalisées à proximité immédiate d'un gène commandant la synthèse d'un ARNt, et c'est aussi à leur voisinage que s'insèrent des coliphages lysogènes. Ce phénomène se retrouve dans une dizaine d'espèces différentes. En outre les différentes séquences d'insertion (IS) trouvées dans le génome du colibacille sont situées pour la plupart au voisinage de l'ADN d'importation. Ces séquences d'insertion, sur lesquelles nous reviendrons, sont essentielles à la mobilité de l'ADN par transposition. Par conséquent les transferts horizontaux d'ADN ont pu s'effectuer à la fois par l'apport des virus et des IS. La taille du génome tend donc à augmenter, mais se voit limiter par excisions et délétions éliminant les séquences nouvelles. Celles-ci seront maintenues néanmoins si elles apportent un avantage sélectif suffisant. Le génome bactérien, au moins celui du colibacille, paraît donc extraordinairement dynamique. Des apports extérieurs ont introduit dans la cellule des gènes fonctionnels et des opérons à l'origine de sauts importants dans les performances, notamment dans les voies de biodégradation. On admet que l'expérience accumulée par l'observation du colibacille, bien qu'il s'agisse d'une espèce assez fortement spécialisée, nous apporte des indications précieuses sur l'évolution des bactéries du sol et des eaux, et le développement de la microflore dans l'environnement. Ces phénomènes intéressent aussi particulièrement l'étude des maladies infectieuses nées de l'acquisition d'un pouvoir pathogène par les souches dotées d'îlots de pathogénécité (Pais).

Quels sont les mécanismes moteurs des acquisitions de gènes étrangers dans la nature ? Les trois principaux sont la transformation, l'infection virale et la conjugaison.

Dans une transformation, la cellule reçoit des portions d'ADN nu à deux conditions. Le nouvel ADN doit pouvoir s'intégrer dans son génome et la bactérie doit se trouver dans un état de "compétence" qui est soit permanent (*Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*), soit obtenu à certains stades de développement (*Bacillus subtilis*). Ce mode d'acquisition permet aux bactéries de renouveler leur stock génétique à partir des débris d'autres cellules. Dans le cas d'*Haemophilus*, l'ADN doit provenir de cellules identiques ou de souches apparentées. L'analyse du génome a permis de découvrir un caractère très curieux. L'ADN exogène n'est accepté qu'à l'aide d'une séquence de reconnaissance dite des 9 bases : AAGTGCGGT. Ce motif est présent 1465 fois dans tout le génome, au sein d'un consensus plus grand (29 pdb) terminé par une région riche en A/T. La spécificité de la transformation semble reposer sur ce dispositif **[17]**.

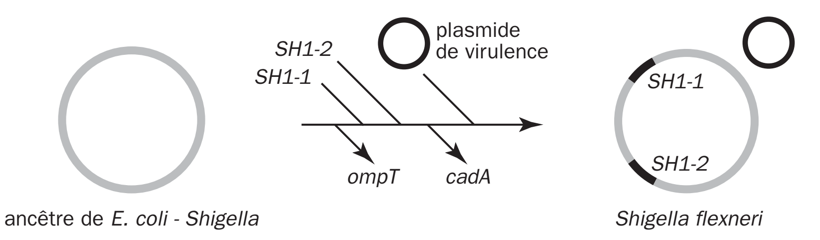
Une infection par bactériophage peut injecter dans l'hôte des gènes provenant d'une autre cellule. Ces derniers sont perpétués dans la descendance si l'ADN apporté par le virus, pouvant atteindre 100 kb, peut s'installer dans l'ADN de l'hôte sous forme de prophage, lequel se transmet à la descendance aussi longtemps que les fonctions de multiplication du virus restent dormantes (lysogénie). Le

prophage peut avoir amené avec lui des gènes provenant d'autres cellules infectées, et c'est ce qu'on appelle la transduction. Les prophages sont nombreux dans les génomes bactériens, ils correspondent souvent à d'anciens virus devenus incapables de clore leur cycle. Des prophages sont présents dans beaucoup d'espèces virulentes dont *Vibrio cholerae* et *Yersinia pestis.*

La conjugaison est comparable à une sexualité rudimentaire, où un contact physique entre un donneur et un accepteur se traduit par la transmission d'un ADN de l'un à l'autre. Un cas particulièrement important est le transfert des plasmides, unités pouvant se perpétuer dans la cellule hôte en réplicons autonomes, s'intégrer au chromosome ou échanger des parties avec celui-ci par recombinaison.

Les propriétés les plus communément apportées par un transfert génétique horizontal sont multiples. La première est la **résistance à des antibiotiques** ou à des facteurs toxiques. Les espèces microbiennes de l'environnement sont soumises à une guerre chimique continuelle qui favorise la sélection de moyens de défense et l'acquisition de gènes codant pour des protéines capables de neutraliser les facteurs adverses, par exemple des enzymes (comme la pénicillinase). Les gènes acquis sont souvent codés par des éléments mobiles facilement transmissibles, plasmides, et transposons, éventuellement intégrés ou facilement éliminés dès que le besoin ne s'en fait plus sentir. Les transposons et intégrons pouvant voyager d'un segment d'ADN à un autre font partie de l'ADN mobile et transportent volontiers des gènes de résistance. Les plasmides sont les vecteurs les plus courants.

D'autres transferts concernent les **facteurs de virulence**. Tout comme l'acquisition d'une résistance aux antibiotiques, celle des facteurs de virulence permet à une espèce de se maintenir dans un environnement hostile et lui confère des propriétés agressives. Il s'agit souvent d'unités génétiques importantes qui apportent avec elles leur propre mécanisme régulateur. Les facteurs de virulence codent pour des toxines, des hémolysines, des protéines adhésives (adhésines), des protéases, etc. Ils peuvent être véhiculés par de grands plasmides ou être apportés par des phages comme dans le cas du vibrion du choléra. L'apparition d'une virulence peut aussi provenir, non pas de l'acquisition de gènes nouveaux, mais au contraire de la disparition d'un facteur qui empêchait tout comportement pathogène **[18]**. Les entérobactéries ont une protéase de surface, OmpT, qui est présente chez les colibacilles non pathogènes mais absente chez *Shigella*. Cette protéase diminue la virulence en s'attaquant à la protéine VirG, dont *Shigella* a besoin pour sa dissémination. Ces bactéries manquent aussi de CadA, une lysine décarboxylase qui inhibe le processus infectieux en formant de la cadavérine. Le cas de *Shigella* est intéressant au regard de l'évolution, car ces bactéries partagent un ancêtre commun avec le colibacille dont elles sont particulièrement proches. Les *Shigella* ont évolué de leur côté. Elles sont devenues des formes pathogènes par acquisition d'un très grand plasmide de virulence (230 kb) et sur le chromosome de plusieurs *Pais** désignés par *SHI-1*, *SHI-2*, en remplacement de régions entières contenant *ompT* et *cadA*. Le dessin évoque ces transformations (dans un ordre chronologique arbitraire) :



Acquisition d'une virulence

On connaît au moins une douzaine de plasmides de virulence et près d'une trentaine d'îlots de pathogénécité chez près d'une vingtaine d'espèces différentes **[19]**. Le *SHI-1* de *Shigella* détermine la formation d'une entérotoxine et d'une protéase, le *SHI-2* une synthèse d'un transporteur et d'un facteur pour piéger le fer qui est aérobactine. Le séquençage de nouveaux génomes révèle des situations extraordinaires. Des espèces dépourvues de toute action pathogène contiennent des séquences voisines des Pais, souvent placés à côté de gènes d'ARNt et appelées îlots génomiques. Ces diverses séquences rapportées ne sont pas toutes inertes. Elles codent éventuellement pour des protéines, des facteurs de symbiose, des transporteurs du fer, une résistance à des antibiotiques ou une dégradation de xénobiotiques. On a l'impression que ces éléments ajoutés et stabilisés par sélection naturelle sont des outils anti-stress, et que la virulence est elle-même une réponse à un stress imposé par le combat avec l'hôte pour récupérer du fer. Il apparaît que la marge est étroite entre une souche inoffensive de l'environnement et une nouvelle forme pathogène. On s'en est rendu compte avec le colibacille. De nouvelles souches virulentes appelées pathotypes sont hémolytiques ou déclenchent des infections hémorragiques intestinales, et sont porteuses de Pais près du gène *selC*, qui code pour un ARNt[8]. Des espèces banales de l'environnement peuvent devenir potentiellement pathogènes. Le *Listeria monocytogenes* présent en particulier dans les matières en décomposition est responsable des listérioses qui sont de graves infections d'origine alimentaire.

Un transfert qui nous intéresse particulièrement ici est l'**acquisition de propriétés métaboliques**. Des germes courants obtiennent les outils leur permettant de coloniser de nouvelles niches écologiques et de profiter des lieux contaminés par des xénobiotiques. L'apport de gènes ou d'opérons entiers a sans doute été courante au cours de l'évolution. Le colibacille et *Salmonella enterica* sont des espèces très voisines, l'une a acquis les gènes d'utilisation du lactose et une meilleure adaptation à coloniser l'intestin des mammifères, l'autre a reçu le pouvoir d'utiliser le citrate. Dans tous les cas où deux espèces voisines se distinguent comme ici par deux propriétés divergentes, la modification s'observe dans une région du chromosome qui n'a pas d'équivalent dans l'autre espèce. En général l'acquisition d'une voie métabolique partielle ou complète s'effectue sous forme de gènes groupés apportés par un plasmide. Il est rare qu'un plasmide s'intègre dans le chromosome autrement que par des recombinaisons de certaines parties ou par

---

8 - *Cet ARNt a un caractère exceptionnel, parce qu'il participe à l'insertion de la sélénocystéine dans certaines enzymes (voir sélénocystéine*).*

des transpositions. Une condition importante pour que la voie importée fonctionne dans son nouvel environnement est la présence des modes de réglages essentiels, à savoir l'induction et la répression des gènes en fonction des conditions. Les nouveaux gènes sont donc apportés groupés en un ou plusieurs opérons accompagnés de gènes régulateurs. Un transfert génétique horizontal par le biais de grandes unités comme les plasmides offre un cadre favorable pour l'acquisition globale d'une nouvelle aptitude. Les exemples abondent en examinant les biodégradations.

La cohabitation des espèces en petit nombre dans des milieux difficiles, comme les sources thermales, favorise probablement des échanges importants, comme le suggère la comparaison de *Thermotoga maritima* avec plusieurs archaebactéries **[20]**. Les transferts paraissent possibles entre organismes n'ayant aucune parenté entre eux. Les gènes liés à la transcription, la traduction et la réplications sont beaucoup plus rarement transmis que les gènes liés aux fonctions métaboliques. Les premiers sont les gènes d'information, ils forment des ensembles complexes et les protéines produites interagissent étroitement les unes avec les autres. On peut donc concevoir que leur exportation en bloc a un caractère beaucoup plus acrobatique, avec un taux de réussite faible. La seconde catégorie de gènes concernent des protéines de "ménage" (*housekeeping proteins*) qui agissent seules ou en comité restreint. Leur acquisition est donc moins susceptible de provoquer de grands bouleversements dans le métabolisme cellulaire.

Des constatations intéressantes ont été faites à partir de *Bacillus subtilis*, bactérie Gram-positive du groupe des firmicutes, où l'on trouve également les *Clostridium* et *Streptococcus*. Le génome complet a été publié par des chercheurs de l'Institut Pasteur **[21]**. Il a l'intérêt de concerner une espèce très commune de l'environnement, connue pour diverses biodégradations, figurant dans un groupe qui occupe des niches écologiques variées (certaines espèces sont des pathogènes). Le génome a une longueur de 4 214 810 pdb, contient près de 4100 gènes codant pour des protéines, dont beaucoup sont impliquées dans la dégradation de molécules d'origine végétale. Les *Bacillus* sécrètent dans le milieu extérieur une palette de protéines comme des protéases, dont certaines sont exploitées industriellement. Le génome de *B. subtilis* révèle 5 *signal peptidases** différentes sans doute en rapport avec ces sécrétions. Il y a aussi des gènes du métabolisme secondaire, comme ceux qui génèrent des antibiotiques. On découvre surtout une dizaine de prophages ou leurs traces, laissant supposer que les transferts génétiques horizontaux ont été abondants et se sont produits à la faveur d'infections virales.

En conclusion, la génomique laisse émerger une nouvelle conception de la séparation des espèces et de leur évolution chez les procaryotes, faisant largement appel à des transferts génétiques horizontaux capables de se produire à grande échelle.

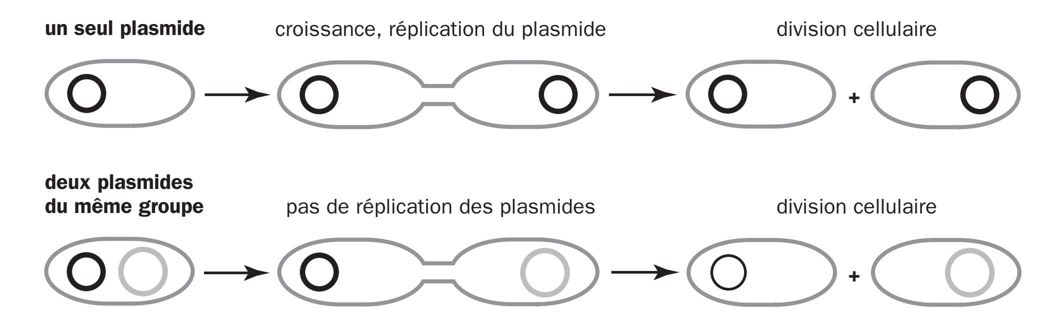
2.4 - PLASMIDES

Cette section et la suivante seront vues comme les résumés de notions décrites dans les manuels de génétique et de microbiologie. Nous l'utiliserons comme aide-mémoire car nous en avons besoin pour comprendre la dynamique adaptative des micro-organismes face aux biodégradations. Les plasmides sont communs chez les bactéries et se présentent généralement comme des unités circulaires d'ADN dont la taille est très variable de 4 kb à plus de 100 kb (mégaplasmides), indépendantes du génome principal ou chromosome et répliquées en même temps que lui au cours des divisions cellulaires. Chaque cellule bactérienne peut en contenir un ou plusieurs exemplaires. Un plasmide contient les signaux nécessaires à sa reproduction sous forme d'unités identiques et constitue un réplicon. Le génome bactérien est lui-même un énorme réplicon, ou "chromosome". Un ADN exogène qui ne respecterait pas ces conditions serait rapidement détruit. Les gènes acquis de l'extérieur doivent donc être intégrés à un réplicon. Les micro-organismes ont le pouvoir fantastique de modifier leur patrimoine génétique par l'accueil de nouveaux réplicons qui peuvent s'intégrer par recombinaison au chromosome ou se laisser propager comme unités indépendantes. Les plasmides se répandent dans une population par contacts entre cellules au cours d'une conjugaison : un donneur réplique son plasmide, garde une copie et injecte l'autre dans la cellule partenaire. Il en résulte une propagation dans la population à la manière d'une infection virale.

La présence des plasmides dans une souche bactérienne est révélée par séparation physique de leur ADN qui est de petite taille et présent sous forme d'une fraction homogène par rapport à l'ADN chromosomique fragmenté en morceaux de taille hétérogène. Sa composition en G + C est éventuellement différente, et les cercles plasmidiques non dégradés sont affectés de super-tours rendant les molécules plus compactes. Les plasmides sont également détectés par des sondes nucléiques spécifiques, et séparés par électrophorèse ou ultracentrifugation. La reconnaissance et la fragmentation des plasmides par nucléases de restriction sont, comme on le sait, des piliers essentiels de la génétique bactérienne moderne. On notera au passage que des organismes eucaryotes, notamment les levures **[22]** et les plantes **[23]**, peuvent héberger aussi des plasmides.

Voici très sommairement quelques points de repère supplémentaires sur les plasmides. On peut distinguer des caractères communs à tous les plasmides, et ceux qui ne se rencontrent pas dans tous mais dont l'importance mérite d'être mentionnée. Les deux caractères fondamentaux communs sont la présence des fonctions réplicatives et l'appartenance à un groupe d'incompatibilité. La réplication exige une ou plusieurs origines de *réplication** reconnues par des protéines spécifiques, codées par le plasmide lui-même ou empruntées à la machinerie cellulaire, et agissant "en *trans*". Ce détail permet au plasmide de se répliquer éventuellement dans une espèce différente qui ne reconnaît pas les mêmes séquences origines, car il apporte ses propres outils. Cette situation est mise à profit artificiellement dans les *vecteurs navettes**. Tous les plasmides se répartissent en groupes d'incompatibilité. On en connaît plus d'une trentaine. Cette propriété est

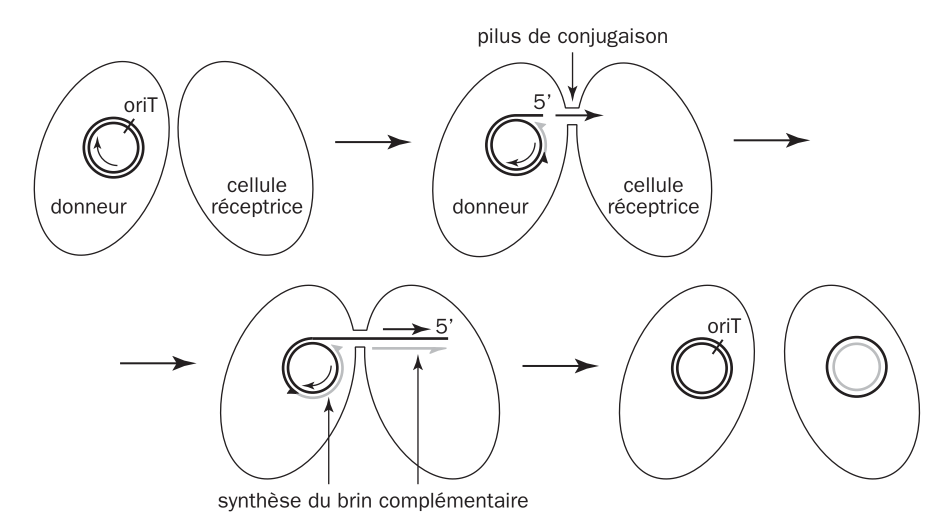
liée à la possibilité pour un plasmide donné d'être présent en exemplaires multiples dans une même cellule, où leur nombre est régulé. Quand deux plasmides en présence appartiennent au même groupe, le mécanisme régulateur ne fait pas la distinction entre eux et compte en bloc le nombre total des origines. Les deux plasmides entrent donc en compétition et tendent à s'exclure mutuellement dans la descendance. Le schéma montre la répartition d'un plasmide à une seule copie, lorsqu'il est mis en présence d'un second plasmide du même groupe. Les plasmides d'un même groupe se font concurrence, ils sont dits "égoïstes". Le nombre des origines reste le même.



Les propriétés particulières appartenant aux plasmides sont nombreuses. Quelques-unes ont déjà été citées, notamment la présence de gènes codant pour un métabolisme ou un pouvoir pathogène. La plupart des plasmides utilisés en génétique moléculaire véhiculent des marqueurs ou gènes de résistance à des antibiotiques qui facilitent le criblage des clones recombinants. Une autre propriété importante des plasmides est de pouvoir intégrer leur ADN par recombinaison dans le chromosome ou de s'en exciser à nouveau. La recombinaison peut aussi porter sur des segments limités.

La conjugaison permet aux plasmides de promouvoir leur propre propagation de cellule à cellule. Ils sont alors dits conjugants (ou conjugatifs). Le plasmide du donneur renferme un site important, *oriT* ou *mob* (pour *origin of transfer* ou *mobility*). Il sert de point de départ du transfert. En outre les gènes *tra* codent pour des protéines qui reconnaissent *oriT* et assurent différentes fonctions, dont le rapprochement des deux cellules et leur communication par un ***pilus***. Un mécanisme assez compliqué déclenche une réplication du plasmide à partir de *oriT*, l'émission d'une copie vers le receveur alors que l'autre reste dans le donneur. Le schéma de la conjugaison en donne le principe simplifié. L'ADN bicaténaire subit une coupure au site *oriT*, et se débobine progressivement sur toute la longueur du cercle, pendant que l'un des brins est émis par un pilus de conjugaison qui forme un pont entre les deux cellules. L'autre brin reste au départ. L'ADN monocaténaire est réparé des deux côtés par une nouvelle synthèse du brin complémentaire, rétablissant l'ADN bicaténaire, et celui-ci est de nouveau soudé en ADN circulaire. On voit donc que ce système de réplication, dit par "cercle roulant", fait passer l'ADN d'une cellule à l'autre sous forme linéaire, avant d'être circularisé à nouveau à l'arrivée après la synthèse complémentaire. Il peut se faire qu'un plasmide ne

soit pas conjugant, mais le transfert peut tout de même avoir lieu avec un site *oriT* reconnu par des facteurs *tra* venant d'une autre source dans le donneur.

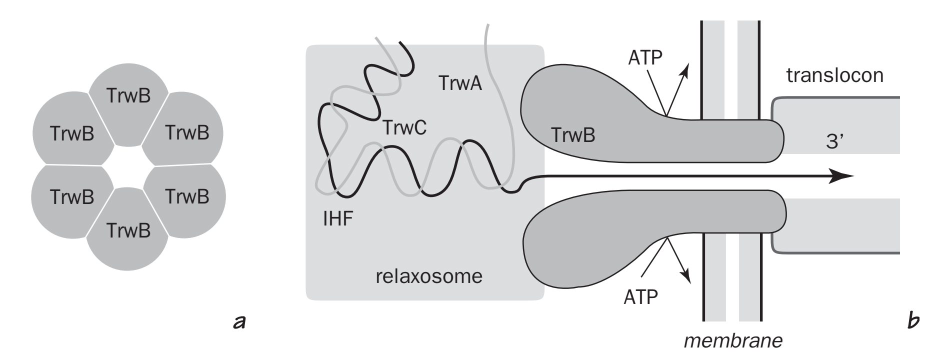


Conjugaison, réplication par "cercle roulant"

La conjugaison du colibacille entre cellules F^+ dites mâles et F^- dites femelles transmet le **plasmide F**. Elle a servi de modèle historique pour comprendre ce très important phénomène de transmission génétique **[24]**. Cette opération est complexe et fait intervenir une série de facteurs différents. Les cellules doivent entrer en contact, établir un pont entre les partenaires et répliquer d'une façon programmée l'ADN à transmettre. Ceci exige plusieurs manipulations moléculaires sur l'ADN, catalysées par des enzymes spécifiques. L'ensemble des opérations met à contribution à la fois des protéines codées par le plasmide et des facteurs de l'hôte. Il y a aussi synthèse de protéines de surface TraS et TraT chargées d'empêcher l'entrée de plasmides F supplémentaires dans une cellule qui est déjà devenue F^+. Le plasmide n'est présent qu'à un seul exemplaire dans la bactérie et entend le rester : la place est prise ! En somme pour faire marcher tout cela, il faut près d'une trentaine de gènes, soit environ la moitié de tous ceux qui ont été identifiés sur le plasmide F. Ils sont tous groupés dans une portion d'ADN d'environ 33 kb appelée région *tra*. Une vingtaine de ces gènes font partie d'un très grand opéron activé par le produit du gène *traJ*. Les cellules F^- deviennent F^+ après transfert et deviennent des donneurs à leur tour. C'est donc toute la population bactérienne qui devient rapidement F^+.

Le plasmide F n'offre pas le cadre le plus favorable à l'étude à cause de sa complexité. Il existe heureusement des plasmides conjugants plus simples, comme le **R388** du colibacille, d'une longueur de 33 kb. Il détermine une résistance aux sulfamides et à la triméthoprime. Deux séries de gènes déterminent les protéines de conjugaison. La première ne code que pour trois protéines, TrwA, TrwB et TrwC. Elles sont en charge des manipulations sur l'ADN et le mécanisme du "cercle roulant" déjà cité. La deuxième série de gènes code pour une dizaine de protéines, de TrwD à TrwM, dont la fonction est d'assurer la communication entre les deux

cellules. Il en résulte trois pièces de machinerie symbolisées sur le diagramme suivant. La première est le **relaxosome**, un ensemble qui a pour effet de préparer l'ADN au transfert. Le deuxième est un anneau formé par **TrwB**, représenté de face (*a*) ou en coupe latérale (*b*). Cet hexamère constitué d'unités implantées dans la membrane forme un canal central large de 8-10 nm. Enfin le ***translocon**** est l'appareil extérieur formant un tube transporteur vers l'autre cellule **[25]**.



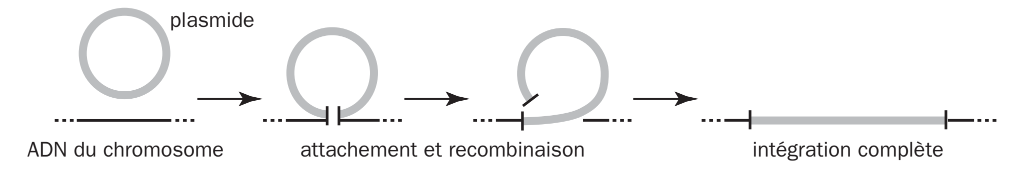
L'appareil de translocation

Cet ensemble fonctionne en gros comme ceci. Pour que le transfert d'ADN ait lieu, il faut que l'un des deux brins soit coupé au site origine *oriT* sur le plasmide de départ, et que les deux chaînes soient séparées : cette dénaturation de l'ADN prépare le brin qui sera expédié de l'autre côté. Pas n'importe quel brin. C'est le brin T, qui pénètre dans le pont intercellulaire extrémité 3' en avant. C'est un peu ce qui se passe quand la cellule réplique son chromosome. L'ADN est dénaturé à partir du point origine et il se crée une fourche de réplication. Une protéine spéciale participe à cette dénaturation et s'empare de l'un des brins de l'ADN dénaturé. La protéine TrwB est similaire à une hélicase. Sa structure détaillée partielle a été déterminée **[26]**. La protéine dénature l'ADN de proche en proche, s'empare de ce filament d'ADN et l'expédie par une ouverture à travers la membrane tandis que l'autre sert de modèle à une nouvelle synthèse (procédé du cercle roulant). Pour faire ce travail, TrwB a besoin d'une source d'énergie et règle le problème en hydrolysant de l'ATP à chaque avancée de la chaîne (le mode de couplage n'est pas encore bien connu). La protéine TrwC a pour rôle de détortiller la double hélice (relâcher les super tours), complète l'action de l'hélicase et peut s'appeler une "relaxase". La protéine TrwA est un régulateur de transcription, elle se lie à l'ADN et agit comme un répresseur. Tout ce dispositif, dont une partie est codée par le plasmide, est complété par des facteurs de l'hôte.

Des mécanismes particuliers règlent la ségrégation des différentes copies d'un même plasmide entre les cellules filles après division. La répartition peut être à ce point inégale que l'une des cellules n'emporte aucun exemplaire. Expérimentalement on peut encourager la perte du plasmide par une action chimique (acridines, bromure d'éthidium, novobiocine), opération appelée *curing*. Inversement, la multiplication des cellules bien pourvues en plasmide peut être encouragée en cas d'avantage sélectif important. En fait tous les plasmides ne

sont pas indéfiniment stables, la ségrégation des copies dans les cellules filles peut être imparfaite et des cellules sans plasmide apparaissent dans la descendance. Elles sont conservées ou éliminées en fonction de la pression sélective du moment. Il peut se faire que plasmides ne portent pas toutes les fonctionnalités autorisant leur réplication intracellulaire ou leur transfert par conjugaison. Ces opérations ne sont alors possibles qu'avec l'aide de facteurs appartenant à d'autres éléments, par exemple un plasmide étranger, un virus, ou des gènes appartenant à l'hôte. Donc contrairement au facteur F qui représente le sommet de la sophistication, beaucoup de plasmides ont besoin d'être "aidés", en particulier dans le cas des plus petits (moins de 10 kb). Sur le plan expérimental, on peut forcer l'entrée d'un ADN plasmidique dans une souche réceptrice par électroporation ou divers procédés physiques ou chimiques qui ont pour effet de créer des lésions momentanées dans la membrane. C'est une possibilité essentielle pour le génie génétique, car on peut utiliser comme vecteurs d'entrée de gènes nouveaux des petits plasmides ou encore des ADN viraux, en s'affranchissement du mécanisme naturel beaucoup plus compliqué. En outre les plasmides les plus petits peuvent exister à près de 50 exemplaires dans la cellule, se répliquent indépendamment du chromosome et permettent une amplification génétique de l'expression des gènes qu'ils renferment.

Une recombinaison peut intégrer un plasmide dans le chromosome et l'information génétique insérée en partie ou en totalité est transmise à la descendance au fil des divisions cellulaires comme le sont les autres facteurs du génome.



Intégration d'un plasmide

On pense que ce phénomène a pu jouer un rôle important au cours de l'évolution pour la diversification des voies métaboliques. Une cellule peut ainsi acquérir en bloc tout un segment lui conférant des propriétés nouvelles. Celles-ci ne seront pas nécessairement exploitées. Il faut pour cela que l'expression des gènes nouveaux obéisse à un certain nombre de conditions, c'est-à-dire ne pas bouleverser les fonctions existantes et obéir à des régulations précises, moyennant quoi la pression sélective du milieu pourra favoriser la nouvelle souche. Le séquençage des génomes a permis de se rendre compte que diverses espèces douées de propriétés de biodégradations ont probablement reçu les gènes nécessaires après de telles intégrations. La disposition primitive des gènes n'a pas toujours été conservée comme un segment distinct, et a été brouillée par des phénomènes de recombinaison et de transposition. L'identité de ces gènes peut néanmoins être devinée par leur structure particulière, l'emploi des codons (*codon-bias*) ou par des homologies de séquence avec d'autres espèces. Un critère remarquable est celui du groupement des gènes, parfois dans un ordre caractéristique qui se retrouve dans des espèces distinctes. On peut alors supposer que les espèces en présence

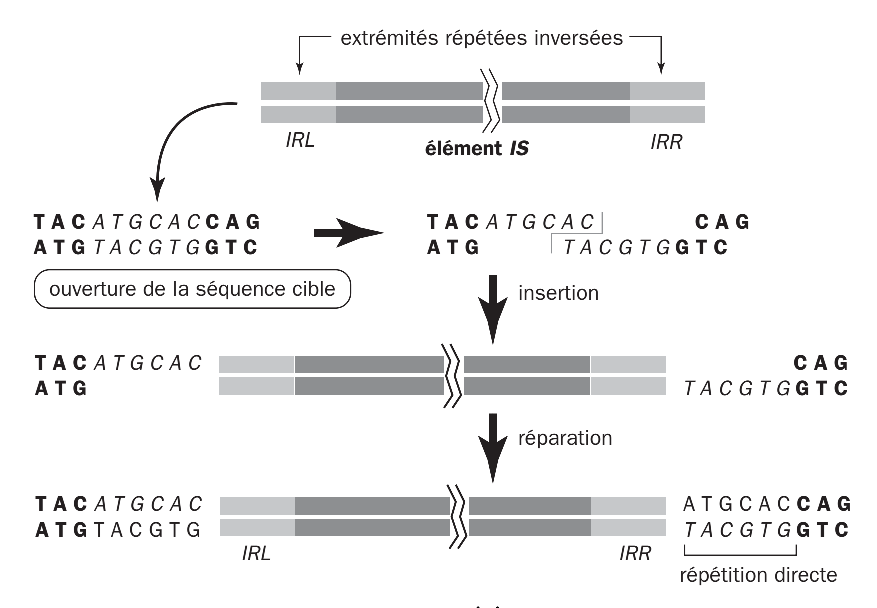
ont été à l'origine "contaminées" par une même séquence de type plasmidique, et en auraient ainsi gardé le souvenir en dépit des remaniements ultérieurs.

2.5 - SÉQUENCES D'INSERTION - TRANSPOSITION

Les transposons sont des éléments d'ADN mobile contenant ce qu'on appelle des séquences d'insertion ou *IS*, capables de sauter d'une position d'ADN à une autre. Chez les bactéries, ils transportent avec eux des éléments variables qui peuvent être par exemple des gènes de résistance à des antibiotiques. La technique est celle du "couper/coller" des ordinateurs dans un traitement de texte. Un fragment du texte est prélevé et inséré ailleurs à un endroit déterminé. Une autre opération consiste à copier le fragment sous forme identique et à l'insérer ailleurs en laissant le premier exemplaire en place. Il en est de même dans une transposition où le fragment d'ADN est transporté d'un endroit à l'autre sans réplication, ou après avoir été répliqué en laissant une copie en place. En somme ABCD*E*FGH deviendrait AB*E*CDFGH dans le premier cas, AB*E*CD*E*FGH dans le second.

La transposition n'est pas réservée aux procaryotes. Découverte initialement chez le maïs par Barbara MCCLINTOCK en 1951, elle a fait l'objet d'observations très détaillées chez la levure, la drosophile, et à vrai dire dans toutes les espèces où on l'a cherchée **[27]**. Cela fait partie des outils dont les êtres vivants disposent pour gérer l'évolution de leur patrimoine génétique. Le déplacement d'un élément peut provoquer des insertions et délétions, ou déplacer une séquence d'un endroit à un autre, en inactivant parfois certains gènes quand l'insertion se produit en leur sein. Une transposition peut aussi avoir des effets plus subtils quand l'insertion dérange les rapports d'un gène avec un promoteur ou une séquence régulatrice. Avec les plasmides, les éléments transposables apportent d'extraordinaires moyens d'adaptation, et constituent des outils de recherche en génétique d'une valeur inestimable.

Les éléments mobiles les plus simples sont les **séquences d'insertion** (***IS***). Elles contiennent de 700 à 1600 bp, encadrées aux extrémités par deux courts segments inversés de 15 à 25 bp. Un élément *IS* contient le signal nécessaire à la transposition, qui est catalysée par une **transposase**. L'enzyme se lie aux deux extrémités répétées inversées (ou *IR*), reconnaît la séquence cible et y effectue l'insertion. La transposase agit sur la cible en y pratiquant une ouverture formant des "bouts collants" à la manière de ce que ferait une nucléase de restriction. Son gène occupe presque toute la longueur intermédiaire de l'élément, et son promoteur se situe en partie dans l'un des segments répétés inversés, qui est désigné par convention comme extrémité gauche *IRL* (inverted repeat, left). L'autre extrémité est *IRR* (inverted repeat, right).



Insertion d'un élément IS

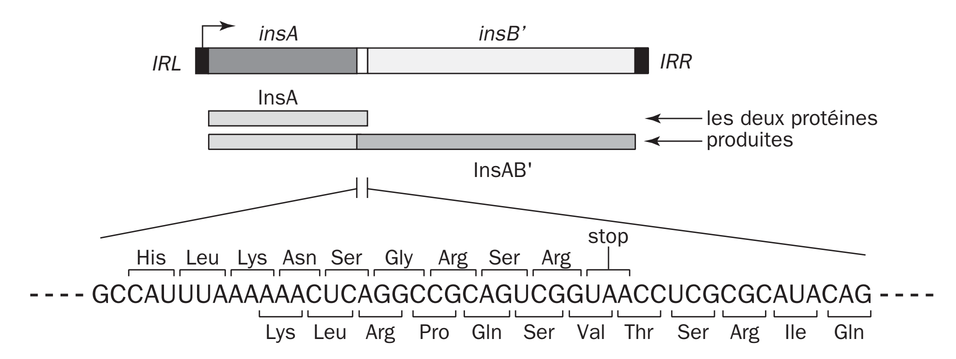
On voit que la petite séquence servant de cible à l'insertion subit une duplication en tandem et l'*IS* s'installe entre les deux copies. Chaque *IS* possède ses caractères propres et le petit tableau en donne une idée en ce qui concerne le colibacille.

IS	*Nombre (E.coli)*	*(pdb)*	*Cible, pdb*	*Répét. inversées, pdb*	*ORF*
IS1	6-10	768	9	18-23	2
IS2	5	1327	5	32-41	1
IS3	5-16	1258	3-4	29-40	2
IS4	1 ou 2	1426	11-12, 14	16-18	1
*IS*5	abondant	1296	4	15-16	1
*IS10R**		1329	9	17-22	1

* Chez *Salmonella typhimurium*, dans la structure du tranposon Tn10.

Le colibacille renferme d'autres *IS* non portés dans ce tableau, comme *IS30*, *IS150*, *IS186*. De nombreux *IS* ont été répertoriés hors du colibacille. Par exemple *IS3* se retrouve dans *Caulobacter crescentus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que chez des pathogènes (*Neisseria meningiditis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae*), des cyanobactéries (*Synechocystis* sp.) et d'autres espèces. En 1998 on répertoriait déjà environ 500 éléments d'insertion dans 159 espèces groupant à la fois des eubactéries et des archaebactéries **[28]**. Le plasmide F renferme une copie d'*IS2* et trois de *IS3*. Les éléments d'insertion sont classés par famille sur la base de caractères communs de structure et de séquence. Les *IS3* et *IS5* sont les plus répandus, *IS1* est le plus anciennement connu et le plus petit. Il a la particularité d'avoir deux

cadres de lectures, A et B, commandés par un promoteur localisé au niveau de l'extrémité gauche (*IRL*). La vraie transposase serait B. L'existence de deux cadres de lecture s'observe aussi dans la nombreuse famille des *IS3*. Le dispositif particulier de *IS1* nous permettra d'introduire une propriété importante d'un élément d'insertion. Pour illustration voici sa carte schématique. Le promoteur est marqué d'une petite flèche sur la gauche de la figure.



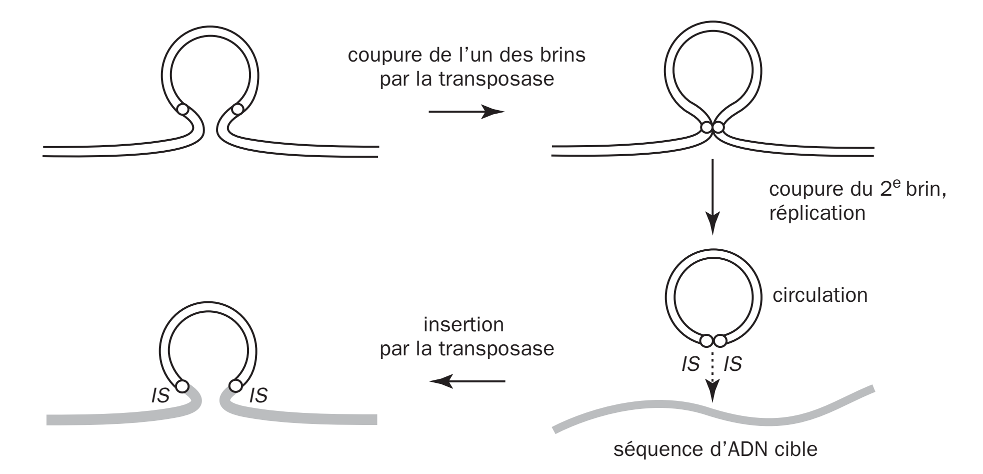
Les deux cadres de lecture de IS1

La transcription à partir de ce promoteur s'effectue en bloc sur toute la longueur de l'élément d'insertion, en ne s'arrêtant qu'un peu en avant de *IRR*. Malgré l'existence des extrémités répétées et inversées (*IRL* et *IRR*), les séquences d'insertion ou *IS* ont donc une polarité dictée par le sens de transcription du gène de la transposase. Ce détail est important pour comprendre le fonctionnement des transposons. Dans 99% des cas, la traduction par les ribosomes ne s'effectue que sur la partie *insA*, car elle y rencontre un codon Stop (UAA). La partie située en aval ne devrait donc pas être traduite, ce qui interdirait la synthèse de la transposase ! Un mécanisme particulier permet de contourner l'obstacle dans un petit nombre de cas. Entre les régions *insA* et *insB'* existe une zone de chevauchement dont la séquence est détaillée dans le bas de la figure. On peut y remarquer une curieuse répétition de 6 fois la lettre A. On a des preuves expérimentales que ce motif fait déraper la transcription en provoquant ce qu'on appelle un changement de cadre de lecture (frameshift) avec la nouvelle séquence de codons comme il est indiqué. Les ribosomes semblent réamorcer la lecture de la suite du message à la faveur de ce changement de cadre. La protéine synthétisée est **InsAB'** et fait office de transposase. La petite protéine basique **InsA** reste majoritaire, mais elle se lie aux séquences terminales *IRL* et *IRR* sur l'ADN et a pour effet d'entraver la transposition de l'élément d'insertion, car ce sont justement les zones que la transposase devrait reconnaître **[29]**. La transposase InsAB', qui n'est faite qu'à taux réduit, ne peut donc effectuer la transposition (avec ou sans réplication dans le cas d'*IS1*) qu'avec une fréquence très faible, qui est de l'ordre de 10^{-7} par rapport aux divisions cellulaires. Si on ajoute une septième lettre A au motif répété de la zone de chevauchement, ou si on en retire une, le cadre de lecture qui devrait normalement déboucher sur le codon Stop s'en voit décalé, et la protéine InsA n'est plus produite (la traduction continue jusqu'au bout). Elle est remplacée par la transposase qui peut fonctionner alors sans entrave **[30]**. Le déplacement de l'*IS*

intervient avec une fréquence bien plus élevée qui est de l'ordre de 0,1 à 1%. Une limitation existe cependant et serait due à un deuxième dispositif ne concernant plus la traduction mais la transcription par l'ARN-polymérase. Une région en fin de *insA* tend à faire cesser la transcription en aval. Les molécules d'ARN messager sont alors tronquées et la transposase n'apparaît pas.

Une propriété importante d'*IS1* et des séquences d'insertion en général est de s'accompagner de mécanismes ayant pour effet de limiter leur propagation. En effet la multiplication des éléments d'insertion dans un génome bactérien devrait entraîner des effets délétères et leur nombre doit être ramené à une valeur acceptable. La destruction de la cellule serait aussi celle de l'*IS*, qui se compare à un parasite réduit à sa plus simple expression. Ces éléments sautent d'une position à l'autre sur l'ADN, soit au sein du chromosome, soit vers un plasmide, avec une fréquence faible de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} par rapport aux taux des divisions. Étonnant : c'est comme si l'élément *IS* se munissait de mécanismes régulateurs avec le souci de freiner le plus possible sa propre multiplication. Il en résulte un taux moyen d'exemplaires à peu près stable dans le chromosome bactérien.

Les effets d'une insertion dans l'ADN peuvent être multiples. La première est l'inactivation d'un gène. Une seconde est d'introduire un ou deux promoteurs supplémentaires provoquant des amorçages de transcription intempestifs, ou inversement d'introduire des points d'arrêt. En outre une insertion peut inactiver ou dévier un mécanisme régulateur. Des effets secondaires parfois inexpliqués se produisent au voisinage d'un *IS*, en particulier une délétion laissant l'*IS* intact. Certains éléments peuvent s'isoler en cercles d'ADN au cours de leur transposition **[31]**, comme l'indique le schéma. L'excision et l'intégration se font par des mécanismes différents d'un *IS* à l'autre, mais ils ne seront pas abordés ici pour des raisons de simplicité. Le principal intérêt des *IS* est leur participation à la mobilité des transposons, dont il sera question dans la section suivante.



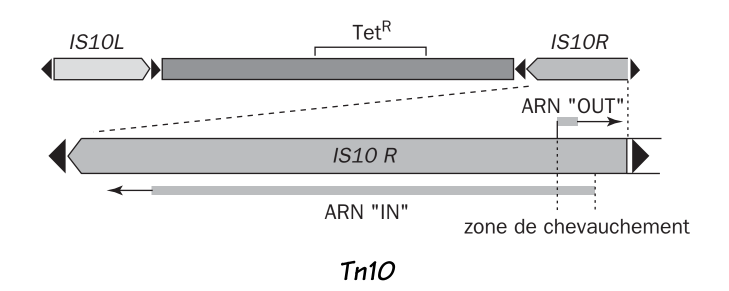
Transposition

La présence des ***IS*** dans un génome (comme celle des transposons) est responsable d'une proportion importante des mutations chez les bactéries, et constitue un facteur d'évolution considérable **[32]**. Les effets des *IS* complètent ceux des gènes mutateurs. En intervenant à taux faible, les mouvements des *IS* sont autant de ballons d'essai évolutifs qui peuvent faire surgir par hasard un avantage sélectif **[33]**. On estime que l'évolution des génomes peut se faire aussi à la faveur de séquences répétitives se succédant en tandem, distinctes des *IS*. Il en existe plusieurs catégories, les ***Rep**** étant les plus courtes. Elles sont nombreuses dans le colibacille et différentes espèces. Les divers éléments répétés le long de l'ADN confèrent au patrimoine génétique une grande plasticité, en permettant le rapprochement de portions éloignées et l'apparition de solutions favorables sous la pression de l'environnement. Ces éléments multiples sont fréquents dans le génome des protéobactéries, le plus souvent sous forme de séquences répétées inversées. Les eucaryotes ont aussi des répétitions en tandem et d'autres structures de ce type **[34]**. Tous ces motifs se rencontrent dans leur quasi-totalité à l'extérieur des gènes, et ne sont donc pas dans les régions traduites en protéines. Certains auteurs pensent qu'une partie du travail des *IS* est de déclencher de temps en temps des transpositions qui viennent inactiver des gènes. Si ces derniers ne sont pas indispensables, la modification est transmise sans inconvénient dans la descendance. Ce phénomène participerait à une simplification du génome en éliminant peu à peu les séquences qui ne servent à rien.

2.6 - LES TRANSPOSONS SIMPLES ET COMPOSITES

Un transposon est donc une portion d'ADN mobile utilisant les propriétés des éléments d'insertion. Dans les transposons de la **Classe 1**, une portion plus ou moins longue est bordée aux extrémités par deux éléments *IS* orientés dans le même sens ou en sens contraire. Ces éléments sont responsables de la transposition de l'ensemble, qui renferme typiquement des gènes de résistance à des antibiotiques. Des exemples classiques sont *Tn5*, *Tn9*, *Tn10*, *Tn903*. Les transposons de la **Classe 2**, appelés quelquefois transposons complexes ou composites, ressemblent à de grands *IS* qui renfermeraient, outre celui de la transposase, d'autres gènes et des éléments régulateurs plus ou moins compliqués. Des exemples sont *Tn3*, *Tn1*, *Tn4*. La longueur des transposons est donc bien plus grande que celle des *IS*, allant de 4 à 21 kb. Tous renferment aussi des gènes supplémentaires qui n'ont rien à voir avec la fonction de transposition. Si les chromosomes bactériens ou les plasmides ne renfermaient que de simples éléments d'insertion comme les *IS* de la section précédente, les avantages physiologiques ne seraient pas toujours évidents. Au contraire la présence des *IS* serait plutôt néfaste par ses effets ravageurs, l'inactivation de gènes utiles étant plus probable que l'apparition fortuite de formules nouvelles et bénéfiques. Le problème prend donc toute sa dimension quand les *IS* accompagnent des gènes déterminés et les transportent avec eux. Beaucoup de transposons peuvent sauter d'un plasmide vers le chromosome et vice versa. Tous ont des mécanismes régulateurs pour

endiguer le taux de transposition et faire de celle-ci un événement plutôt rare. Enfin il existe pour mémoire des transposons de **Classe 3**, qui sont des bactériophages multipliés par transposition, leur chef de file étant le bactériophage Mu.



Tn10

Le transposon ***Tn10*** est un premier exemple. Sa longueur est de 914 bp et il appartient à la classe 1. Il correspond à la catégorie des transposons composites, du fait qu'il existe un élément *IS* à chaque extrémité. Ces éléments ici sont des *IS10*. Ils diffèrent légèrement par quelques paires de bases et on les distingue par les sigles *IS10L* (gauche) et *IS10R*[9]. Les deux éléments *IS* pourraient théoriquement être fonctionnels et commander chacun une transposition par leur transposase. En fait seul l'*IS10R* a ce pouvoir. La transposase d'*IS10L* n'apparaît que dans certaines situations, par exemple quand le transposon est dans un environnement où il existe un promoteur extérieur capable de promouvoir la transcription de *IS10L*. Le transposon transporte en outre des gènes de résistance (Tet^R) aux tétracyclines, à la bléomycine, à la néomycine, et plusieurs cadres de lecture dont quatre sont homologues de gènes bactériens impliqués dans le métabolisme des acides aminés **[35].** Au point de vue évolutif, ce type de structure aurait pu naître à la faveur de la présence de deux *IS* voisins encadrant par hasard plusieurs gènes, dont la propagation en bloc rendue possible aurait apporté un avantage sélectif.

Le schéma de *Tn10* indique le dispositif intéressant qui contribue à limiter le taux de sa transposition. L'extrémité d'*IS10R*, seule fonctionnelle, comporte deux promoteurs se chevauchant en partie sur une longueur de 36 pdb, l'un commandant la transcription vers la droite (ARN *"OUT"*) sur 69 bases, l'autre vers la gauche et formant un ARN beaucoup plus long (ARN *"IN"*). Cette dernière transcription commande la synthèse de la transposase. Il y a donc conflit entre deux transcriptions. Mais le combat est quelque peu inégal. Le promoteur *"OUT"* est un promoteur fort, fonctionnant avec un temps moyen de 70 minutes, alors que l'ARN *"OUT"* est beaucoup plus instable, avec seulement 40 secondes de vie moyenne. Il se comporte comme un ***anti-sens**** **[36]**. Cet ARN est susceptible d'empêcher la synthèse de la transposase, non seulement dans le même *Tn10*, mais dans d'autres transposons identiques se trouvant dans la même cellule. En outre la protéine transposase est instable, et n'agit essentiellement qu'en *cis* à courte distance aux extrémités du transposon (sur les deux *IS*). Aussi lorsque la cellule contient

---

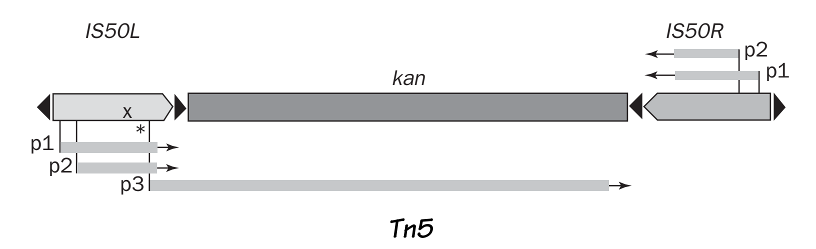
9 - *Le choix d'une gauche et d'une droite étant évidemment purement conventionnel !*

plusieurs exemplaires de *Tn10*, aucune augmentation du rythme des transpositions n'est observée. À cela s'ajoute une difficulté supplémentaire. La transposase n'est active que sous forme multimérique comportant plusieurs sous-unités identiques, et la réalisation d'un polypeptide isolé reste insuffisante !

Un autre mode de contrôle de la transposition tout aussi étonnant agit par méthylation de l'ADN. Celle-ci intervient sur l'adénine dans le motif 5'GATC3', reconnue par la D-adénine méthylase (sites *dam*). Il a été question de ce système dans la première section de ce chapitre. Une séquence *dam* se trouve dans le promoteur de la transposase (dans l'*IS10R*) et gêne le démarrage de la transcription. Quand cette séquence est hémiméthylée sur un brin d'ADN, l'ARN-polymérase se lie plus efficacement, l'expression du gène de la transposase est augmentée ainsi que le rythme des transpositions. Pourquoi ce dispositif ? Probablement pour favoriser la transposition juste après la réplication de l'ADN, ce qui offre au transposon une meilleure opportunité de sauter d'un réplicon à l'autre[10]. Ce n'est pas tout. Les petites répétitions inversées de l'*IS10R* contiennent aussi un site *dam*. Or la transposase qui est chargée de reconnaître ces extrémités ne s'y intéresse que si elles sont hémiméthylées, donc juste après le passage de la fourche de réplication. Ce réglage très subtil veille donc à ce que la transposition ne survienne si possible que juste à ce moment-là !

En résumé s'exercent au moins quatre actions pour contrôler cette transposition : l'apparition d'un ARN anti-sens, une transposase instable constituée de plusieurs polypeptides, une méthylation sur le site *dam* du promoteur, une méthylation des sites *dam* aux extrémités de l'*IS10R*.

Le **transposon *Tn5*** (5700 bp) présente une situation assez comparable. La partie centrale contient aussi un marqueur de résistance (à la kanamycine) entre deux éléments d'insertion, *IS50L* et *IS50R*. Ces derniers ne diffèrent entre eux que d'une seule base, marqué d'une étoile sur le dessin. La transcription centripète pour une transposase part des deux côtés à partie d'un promoteur (p) et la disposition est presque symétrique.



Tn5

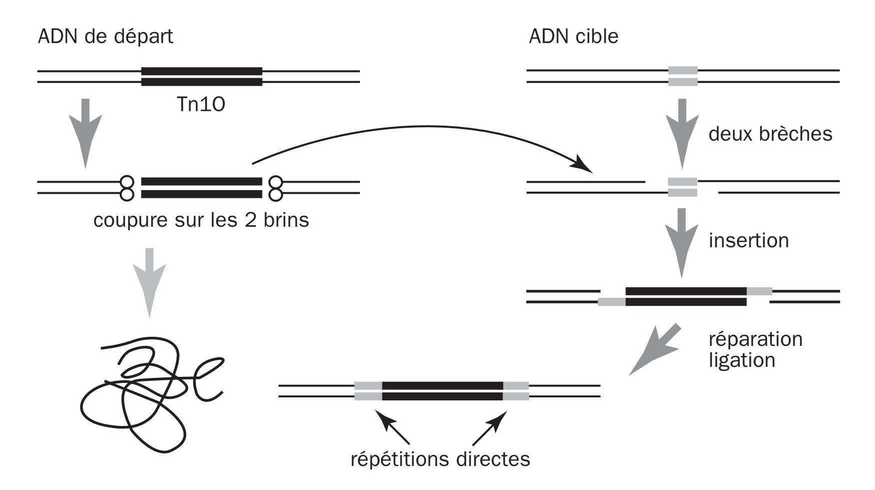
Le fonctionnement de *Tn5* met en jeu non seulement les facteurs du transposon lui-même, mais des protéines étrangères provenant de l'hôte. Limitons-nous aux faits marquants. Du côté de l'élément de droite, ***IS50R***. La séquence renferme deux

10 - *Le chromosome apparaît en double avant que les deux cellules se séparent. Dans une bactérie en cours de multiplication rapide, comme le colibacille en milieu favorable, la séparation des cellules est en retard sur la synthèse d'ADN, ce qui fait que la cellule peut contenir 4 exemplaires du chromosome et plus.*

promoteurs successifs, p1 qui lance la transcription de l'ARN messager de la **transposase**, une protéine de 476 acides aminés, p2 qui est décalé en aval et détermine un messager plus court tout en utilisant le même cadre de lecture. Il en résulte une protéine incomplète Inh qui n'a que 421 acides aminés au lieu de 476 et n'a pas d'activité comme transposase. Elle se comporte en **inhibiteur** de la transposition. Son mécanisme d'action est mal connu, mais elle est fabriquée en excès par rapport à la transposase. Il y a une explication possible. La transposase n'est active que sous forme de multimère (comme celle de *Tn10*). La protéine Inh avec sa longueur un peu plus courte pourrait jouer le rôle de sous-unité de la transposase et la protéine multimère hybride contenant à la fois les sous-unités correctes et Inh, serait inactive comme transposase **[37]**. Par conséquent, la présence de Inh aurait de toute façon une action inhibitrice. Quoiqu'il en soit, c'est probablement un système de contrôle freinant la mobilité de *Tn5* comme dans le cas de *Tn10*. En outre le *Tn5* a aussi un contrôle de type *dam* comme dans le cas précédent.

Que fait l'élément d'insertion ***IS50L*** dans *Tn5* ? La même disposition est observée puisque la séquence est la même, mis à part le remplacement d'une seule base. Or ce changement introduit un codon Stop dans l'ARN messager, une cinquantaine de bases avant le Stop normal. Les protéines faites en fonction de p1 et p2 de *IS50L* sont donc tronquées, la transposase est inactive et a une action inhibitrice comme Inh. La transposition dépend donc totalement de la transposase faite par l'autre *IS*. En outre le changement de base active un nouveau promoteur pour une transcription vers le centre du transposon (de gauche à droite sur le schéma). L'expression des gènes contenus dans cette partie est alors sous la dépendance de *IS50L*. En résumé *IS50R* contrôle la transposition, *IS50L* dirige l'expression des gènes transportés par le transposon *Tn5*.

Comment la transposition de *Tn5* et *Tn10* est-elle réalisée ? Ces unités et celles du même type sont mobiles par **transposition conservatrice** selon le principe du "couper/coller". L'élément transposable est excisé du site de départ en laissant derrière une cassure irréparable entraînant la destruction du réplicon donneur.



Au site d'insertion sont crées des coupures décalées. L'élément s'y installe, les brèches sont réparées et ligaturées. Le nombre de transposons n'a pas augmenté. Il ne le sera qu'à la faveur des divisions cellulaires.

On sait que la transposition entraîne une duplication de la petite séquence cible. Le transposon *Tn10*, découvert en 1968 par WATANABE et coll., a donné lieu à de nombreuses recherches. Il a la particularité de s'installer à des endroits déterminés et l'on retrouve donc de chaque côté d'un *Tn10* après transposition une séquence appartenant au même consensus de 9 bases (où N désigne n'importe quelle base), soit –NGCTNAGCN–>, et sur le brin complémentaire –NGCTNAGCN–> [11].

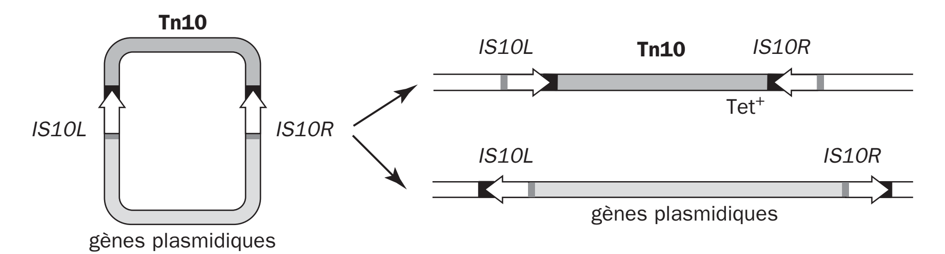
Le passage du transposon d'une molécule d'ADN à une autre est un événement rare par rapport au rythme des divisions celulaires : un *Tn5* ou un *Tn10* présent dans le chromosome se voit répliqué en même temps que lui. Le mode de transposition garantit qu'il n'y aura pas d'augmentation du nombre des transposons. C'est heureux pour la cellule, car la présence d'un transposon introduit des anomalies, telles que des promoteurs supplémentaires ou des signaux d'arrêt de transcription. Il en résulte au niveau des gènes voisins des expressions sauvages et des perturbations dans les régulations, affectant les réglages de l'activité cellulaire.

Si maintenant on revient à la structure des deux *IS* terminaux de *Tn5*, chacune est bordée comme il se doit par des répétitions inversée de 19 bp, qui devraient être identiques, au nombre de 4 par transposon. Elles ne le sont pas exactement. La séquence la plus externe de chaque *IS* diffère de celle qui est en contact avec la partie centrale de *Tn5* par 7 positions. Cependant ces deux morceaux de séquence sont reconnus par la transposase dans *IS50R* aussi bien que dans *IS50L*. La transposase est une enzyme perfectionnée qui catalyse plusieurs réarrangements dans l'ADN. Elle est aidée par d'autres protéines provenant de la cellule hôte : Dam (la méthylase déjà rencontrée), DnaA impliquée dans l'amorçage de la réplication du chromosome, et des protéines qui ont la propriété d'induire des courbures dans l'ADN (Fis, IHF). Il s'agit de mécanismes de reconnaissance très subtils, car le simple changement d'une base dans ces portions de séquence relativement courtes amène immédiatement de fortes perturbations ou abolit l'activité de la transposase.

L'entrée d'un transposon dans un plasmide est certainement un facteur d'évolution dans une population. Voici un dessin montrant les deux façons qu'à un *Tn10* de s'insérer dans un plasmide. L'opération peut conduire à l'apparition d'un nouveau transposon de grande taille, ici avec des éléments d'insertions retournés mais fonctionnels. Un détail à retenir, parce que l'analyse des génomes révèle que des segments importants dans les plasmides ou le chromosome figurent dans ce qui semble être un ancien très grand transposon.

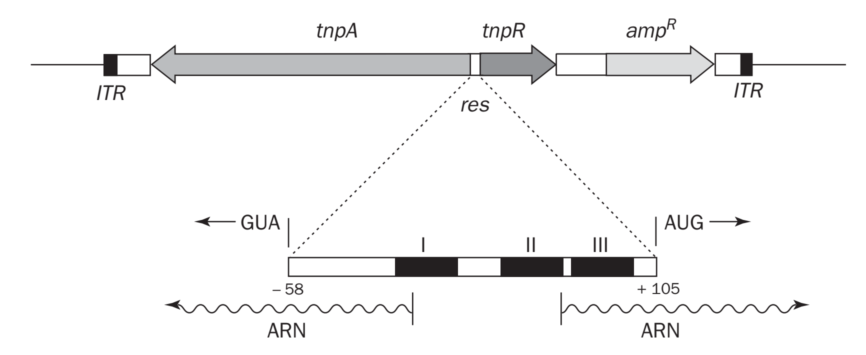
---

11 - Lu dans l'autre sens sur l'ADN, le consensus est donc symétrique.



Plasmide porteur de Tn10

Le ***Tn3*** est un transposon de **Classe 2**, découvert en 1974 par HEDGES et JACOB, par son pouvoir de transmettre un facteur de résistance à la pénicilline de plasmide à plasmide ou de plasmide à chromosome. Le *Tn3* est non-composite, car il correspond à une seule séquence d'insertion qui aurait été dilatée jusqu'à 5 kb environ de façon à héberger des gènes supplémentaires non nécessaires à la transposition.



Transposon Tn3

Aux extrémités se trouvent des séquences répétées inversées de 38 bp (*ITR*). Ici intervient une situation nouvelle : *Tn3* subit une **transposition réplicative**, où un exemplaire reste au départ tandis que le second s'installe ailleurs. Deux protéines essentielles sont codées par le transposon dans des directions divergentes : une **transposase** (TnpA) et une **résolvase** (TnpR). La région *res* a une fonction particulière dans la réplication, et c'est là que se chevauchent les deux promoteurs, un pour la transcription de *tnpA*, l'autre pour *tnpR*, comme l'indique le dessin. La région *res* est détaillée. Les sites I, II et III sont reconnus par la résolvase, le site I étant *res* proprement dit. Les deux ARN divergents sont indiqués, ainsi que la position relative du codon marquant le début de la traduction, aux bases – 58 et + 105 du site *res*.

La réplication s'effectue par une succession de coupures et d'échanges. Une jonction réunit l'ADN donneur et l'ADN cible au niveau des brèches formées. La structure formée est dite en X d'après les images en microscopie électronique. Elle est soumise ensuite à réplication et réparation. Elle correspond à deux fourches de réplication qui avanceraient l'une vers l'autre. Le transposon et l'ADN cible étant

initialement sur deux réplicons différents (par exemple deux plasmides), une recombinaison faisant suite à la réplication forme un cercle unique, le **co-intégrat**. On y retrouve les deux réplicons et deux exemplaires du transposon. La réplication n'a pas affecté que le transposon de départ, mais aussi la séquence cible qui apparaît maintenant en double.

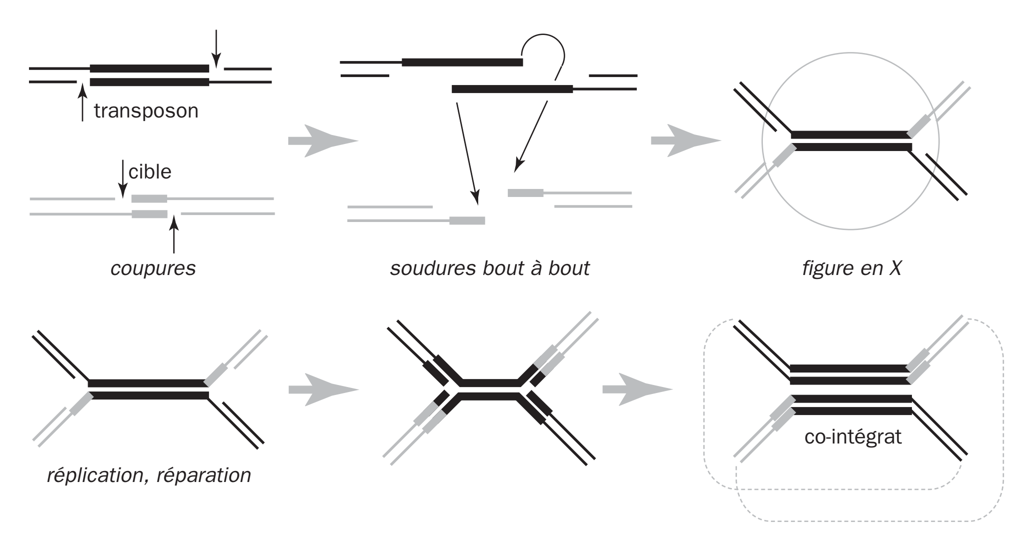
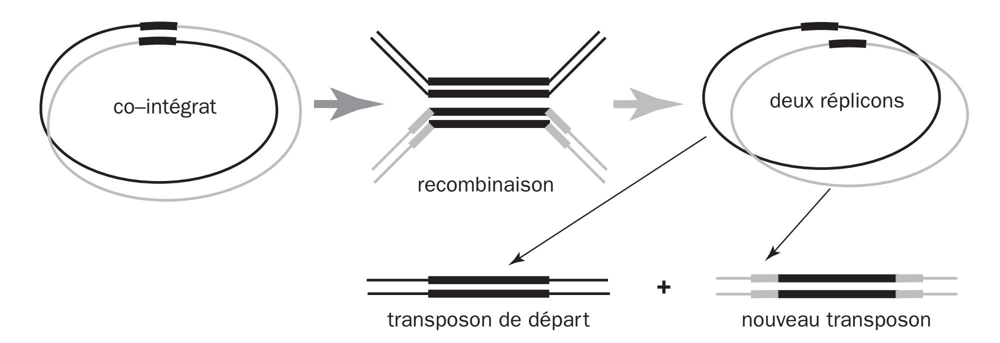


Figure en X, réplication, formation d'un co-intégrat

Le co-intégrat correspond à deux cercles d'ADN entortillés l'un dans l'autre et incapables de se séparer. Pour mener à bien la séparation, il est nécessaire de faire dans un cercle une coupure suivie immédiatement d'une nouvelle soudure. Cette tâche délicate revient à la résolvase, assistée par des protéines cellulaires qui participent à l'entretien de l'ADN. Lorsque le co-intégrat a été démêlé, le transposon initial se retrouve intact dans son environnement de départ, mais sa nouvelle copie transportée dans l'autre réplicon est bordée de deux séquences répétées de même orientation.



La transposase démêle le co-intégrat

Ces mécanismes comportent donc une réplication et la résolution du co-intégrat. Ils déterminent une multiplication du transposon qui est plus rapide que le seul rythme

des divisions cellulaires. Là encore interviennent des mécanismes régulateurs qui empêchent une multiplication trop intense des transposons qui aboutirait à la mort cellulaire. Des complications supplémentaires surgissent quand certaines bactéries, contrairement à la majorité d'entre elles, ont plusieurs chromosomes. Ceci facilite les recombinaisons et les transpositions. Certains *Brucella* ont deux chromosomes (2100 et 1200 kb) portant l'un et l'autre des gènes essentiels à la survie. D'autre part les bactéries en croissance rapide ne sont pas strictement haploïdes et plusieurs copies du génome peuvent coexister à différents stades de la réplication quand celle-ci est en avance sur les divisions. Chez certaines espèces la polyploïdie est la règle même au repos. C'est le cas de *Deinococcus radiodurans*, où il y a 4 ou 5 copies du chromosome, ce qui lui permet de reconstruire rapidement des exemplaires corrects après une exposition prolongée à des radiations.

L'ADN du **bactériophage Mu** est comparable à un très grand transposon de classe 2 (38 kb). Il est capable de s'intégrer à peu près n'importe où dans le chromosome du colibacille, contrairement à l'ADN Lambda qui s'installe en un site précis. Le transposon Mu naît de l'entrée d'une particule infectieuse, s'intègre en prophage par un mécanisme de transposition conservatrice à partir de l'ADN viral, et se transmet comme un prophage au cours des divisions cellulaires. Comme dans Lambda, la plupart des gènes du transposon Mu restent dormants pendant le stade lysogène. Ils s'expriment après induction au cours de la phase lytique, conduisent alors à de nombreuses transpositions réplicatives et à la synthèse de nouvelles particules infectieuses. La présence du prophage Mu dans un génome provoque un certain nombre d'accidents génétiques, notamment des délétions.

Il existe donc une vaste gamme d'éléments d'ADN mobiles, allant des *IS* rudimentaires au transposons de la classe 1, à ceux de la classe 2 jusqu'à des édifices génétiques au programme perfectionné comme Mu. On peut s'interroger sur la signification des éléments transposables dans la nature et leur maintien dans les cellules où leur présence pourrait s'accompagner de divers désordres. Nous avons vu que la transposition est limitée à un taux faible, le cas du phage Mu en phase lytique mis à part. En fait il existe dans les populations de micro-organismes un impératif très important qui est celui de connaître des mutations leur permettant d'évoluer. Dans une population contenant un nombre immense de cellules, chaque événement mutationnel a de grandes chances d'apporter des effets délétères, et les cellules correspondantes seront éliminées par sélection sans que le volume de la population s'en ressente vraiment. Mais les mutations nouvelles peuvent aussi amener des combinaisons favorables, permettant par exemple de mieux résister à des conditions adverses ou d'acquérir une activité enzymatique nouvelle ou plus performante. Il existe de nombreux mécanismes mutationnels. La mobilité de l'ADN est l'un d'eux. Toute cellule amenée à se multiplier plus rapidement peut engendrer une descendance capable de conquérir peu à peu le milieu. Le passage d'information génétique d'une cellule à une autre par insertion dans des plasmides et conjugaison est un mécanisme capable d'accélérer la propagation des trouvailles utiles. La transposition fait donc partie des moteurs de l'évolution, en particulier dans l'apparition de formes compétentes pour effectuer une biodégradation.

Il est intéressant de constater que toute situation de stress imposée à une population tend à stimuler à la fois les mécanismes de réparation et les échanges d'ADN. Par exemple la réponse SOS déclenchée chez le colibacille par irradiation ultraviolette provoque l'induction de nombreux gènes dont celle des gènes *umu* dont l'expression conduit à une augmentation du taux de mutation. Un état de stress augmente aussi le taux de transposition de certains éléments. Il s'agit donc bien d'une réponse de défense permettant d'explorer des issues possibles. Sur des milliards et des milliards d'individus, peu importe que la plupart des mutants disparaissent après mutation pouvu que quelques cellules tirent le numéro gagnant et perpétuent la lignée [12].

2.7 - INTÉGRONS ET CASSETTES

Comment un micro-organisme peut-il devenir résistant à un facteur toxique étranger ? Pour que sa propriété de résistance reste stable dans la population considérée, il est nécessaire que la modification génétique soit transmise à la descendance. Les individus résistants seront donc sélectionnés et leur proportion ne fera qu'augmenter au sein de la population. Il y a plusieurs façons de résister à l'agression chimique exercée par les antibiotiques ou par des polluants divers. L'une d'elles est de modifier la cible intracellulaire que l'agent toxique vient perturber. Un exemple classique est la streptomycine, dont l'action paralyse la synthèse protéique des procaryotes en agissant au niveau de la protéine S12 des ribosomes. Une mutation génétique altérant cette protéine sans léser le fonctionnement des ribosomes rend les cellules résistantes. Un autre mécanisme de résistance apparaît lorsqu'une ou plusieurs mutations rendent la membrane imperméable à la pénétration de l'agent hostile. Enfin l'acquisition d'une enzyme capable de détruire ou de neutraliser l'agresseur est un mécanisme important dans l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques. Un bon exemple est celui des bêta-lactamases neutralisant les pénicillines. Dans tous les cas la résistance naît d'une ou plusieurs modifications génétiques par mutation de gènes préexistants ou par l'apport de gènes nouveaux à partir d'une origine extérieure. Cette deuxième possibilité est examinée ici.

Les structures génétiques appelées **intégrons** ont attiré l'attention comme supports de résistances multiples à des antibiotiques. Ce phénomène est une calamité faisant naître des souches pathogènes, le plus souvent Gram-négatives, qui ont acquis la capacité de résister à une batterie d'antibiotiques, utilisés en thérapeutique. Il est devenu clair que les bactéries devenaient résistantes par l'acquisition de gènes nouveaux exprimés au sein de la cellule. On s'est aperçu que certaines espèces pouvaient de la même façon acquérir des facteurs de virulence, c'est-à-dire des gènes dont l'expression rendait les bactéries pathogènes, soit par la formation de toxines, soit par d'autres facteurs facilitant la pénétration et la

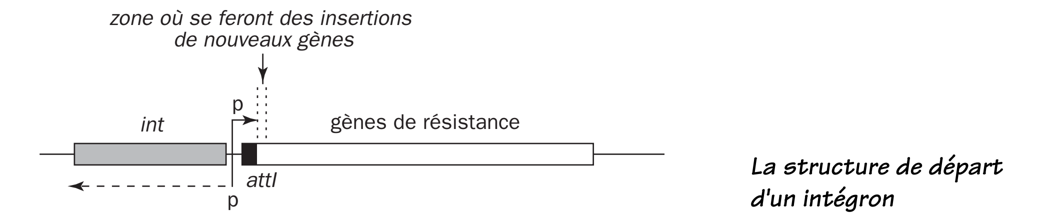
---

12 - *Comme disait la publicité d'une loterie bien connue, tous les heureux gagnants sont des gens qui ont joué !*

multiplication du germe dans l'organisme infecté. Le même principe utilisé par les bactéries pour se défendre peut aussi leur permettre de passer à l'attaque.

Une information génétique étrangère ne peut se maintenir et s'exprimer dans la souche réceptrice que si elle s'intègre à un réplicon. Encore faut-il que ces gènes soient en aval d'un promoteur ad hoc pour être exprimés. Plasmides et transposons apportent couramment ces promoteurs, et les gènes nouveaux arrivent dans une structure qui est capable d'assurer à la fois sa réplication et son expression. Il peut arriver aussi qu'un ou plusieurs gènes soient introduits à l'état "sec" sans être accompagnés du promoteur nécessaire, dans un petit ADN circulaire muni seulement d'une séquence d'attachement. Cet ADN porteur est une **cassette**, incapable de s'exprimer et de se répliquer si elle n'est pas intégrée dans un ADN cible. Ce dernier apporte les fonctions manquantes essentielles, notamment production d'une intégrase, un site spécifique d'attachement et un promoteur. La cassette diffère d'un plasmide par sa taille réduite et son incapacité à se répliquer par ses propres moyens. Elle deviendra fonctionnelle après intégration dans un ADN cible servant de structure d'accueil. Celle-ci est appelée intégron. Elle assure à la fois l'intégration de la cassette et son expression.

L'intégration d'une cassette met en jeu une recombinaison spécifique de site 38. On y rencontre trois éléments essentiels : une portion codant pour une **intégrase** (*int*), un **promoteur** fort (c'est-à-dire efficace) et un **site d'insertion** (*attI*). L'intégrase travaille spécifiquement sur le site *attI*, où se fera l'intégration d'une cassette, juste en aval du promoteur, de telle sorte que les nouveaux gènes pourront être transcrits et exprimés. Le dessin indique le modèle de base d'un intégron. L'apport d'une cassette constitue la partie variable entre deux zones constantes. Celle de gauche sur le dessin contient les trois facteurs essentiels (*int*, promoteur fort noté (p), et *attI*). Dans la partie droite figurée par le rectangle blanc sont localisés plusieurs facteurs de résistance. Cette zone caractérise l'intégron. Dans ceux qui ont une structure complexe, cette partie peut être assez longue.



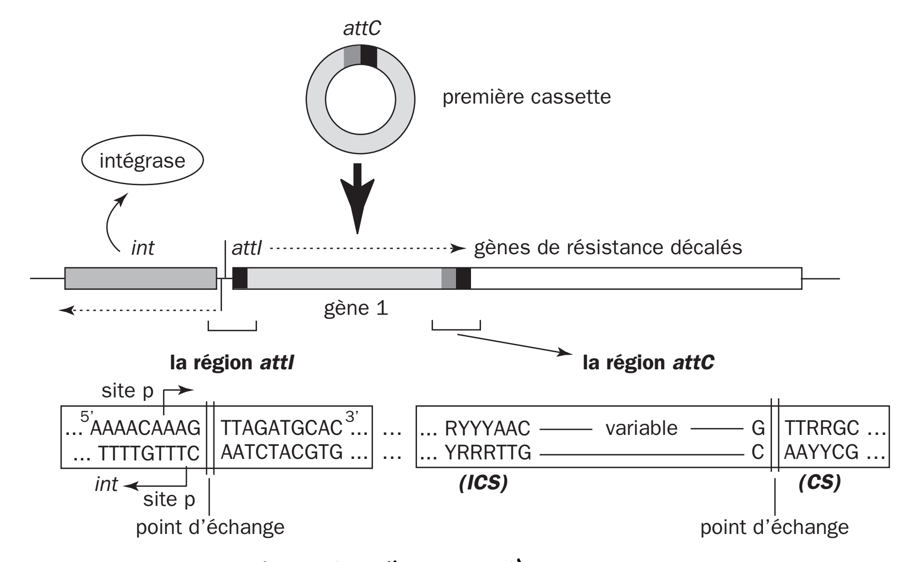
La structure de départ d'un intégron

On peut voir qu'il y a en fait deux promoteurs (p) en partie superposés sur le même segment d'ADN, mais l'un concerne la transcription du gène de l'intégrase vers la gauche (*int* et flèche en pointillé), l'autre vers la droite pour la transcription des nouveaux gènes qui seront introduits dans la région indiquée en amont de gènes préexistants qui sont des facteurs de résistance **[39]**. Leur promoteur est efficace et fonctionne beaucoup plus souvent que celui de l'intégrase en direction des gènes introduits à partir des cassettes. L'existence de transcriptions divergentes à partir de promoteurs partiellement chevauchants est une disposition banale chez les bactéries. L'une d'elles commande souvent la synthèse d'une protéine régulatrice, qui

contrôle la transcription des gènes en direction opposée. La protéine régulatrice est ici l'intégrase qui permet l'installation de la cassette. Les deux transcriptions opposées n'utilisent pas comme modèle le même filament d'ADN. Un promoteur est reconnu sur l'un d'eux, l'autre sur le brin complémentaire.

Comment les cassettes sont-elles constituées ? À l'état libre dans le cytoplasme bactérien, une cassette est donc un petit ADN circulaire dépassant rarement 1 kb, renfermant un gène de résistance (par exemple à un antibiotique) sans promoteur mais avec une séquence d'insertion *attC*. Un gène étranger transporté ne peut pas s'exprimer tant qu'il n'a pas été introduit dans un intégron.

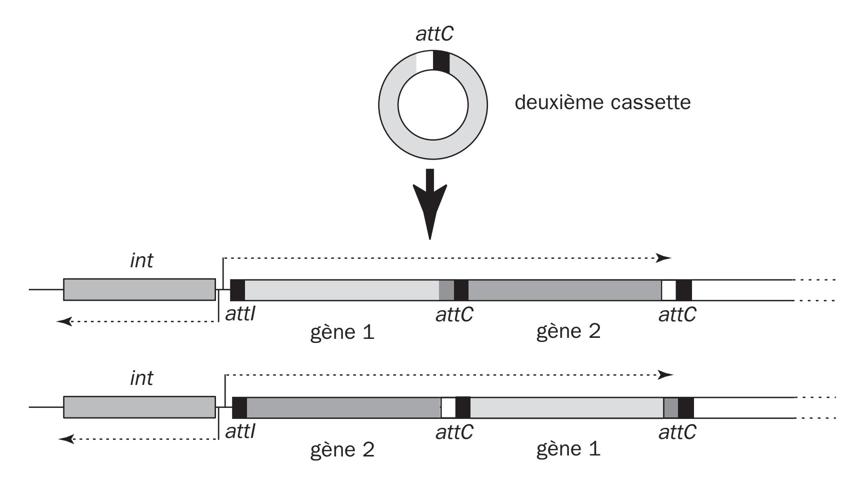
Le site *attC* s'appelle aussi élément "59 bases", bien que sa longueur varie d'une cassette à l'autre de 57 à 141 bp. Sa structure est celle d'un palindrome imparfait et contient un élément de séquence consensus retrouvé dans *attI*, **GTT**RR(C ou G)RY (où R désigne une purine A ou G, et Y une pyrimidine C ou T). L'intégrase reconnaît à la fois la partie de l'intégron où se trouve *attI* et le site *attC* dans une cassette. Celle-ci sera positionnée par coupure et recombinaison entre les sites *att*.



Insertion d'une première cessette

Le dessin montre des détails de séquence aux régions *attI* et *attC*, au niveau du consensus critique GTTRR. Les petits rectangles en noir soulignent les courtes régions qui se ressemblent entre *attI* et *attC*, autorisant ainsi la recombinaison. La séparation se fait entre G et T **[40]**. Deux répétitions inversées sont visibles aux extrémités de la région *attC*, qui est donc partiellement palindromique aux deux bouts. Elles sont désignées par **CS** (*core site*) et **ICS** (*inverted core site*). Une fois intégré, le gène apporté par la cassette peut être transcrit en même temps que les gènes qui étaient déjà présents. La région constante représentée par le rectangle blanc est transcrite à partir de un ou plusieurs promoteurs situés plus loin sur l'ADN qui n'ont pas été représentés.

Une propriété remarquable des intégrons est de pouvoir accueillir successivement plusieurs cassettes, conduisant à un empilement de gènes placés à la queue leu-leu et accumulant des facteurs de résistance à des antibiotiques ou à des facteurs toxiques. Comment cela se peut-il ? La région *attC* apportée par chaque cassette contient le même consensus (*CS*) que celui qui est dans le site d'intégration initial *attI*. Ce consensus est donc reconnu comme un site d'intégration. Le dessin montre l'arrivée d'une deuxième cassette. L'insertion peut se faire sur *attI* ou un *attC*, avec une préférence pour le premier. La figure montre qu'il y a deux possibilités.



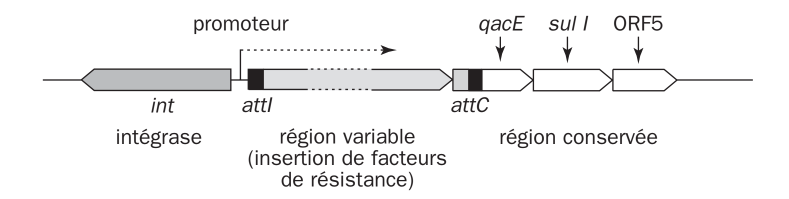
Insertion d'une deuxième cassette

Chaque intégron continue à faire son **intégrase**, laquelle fait partie d'une famille de protéines où l'on reconnaît déjà plus d'une centaine de membres **[41]**, dont celle du phage Lambda. Toutes ces enzymes fonctionnent sur le même principe qui est potentiellement réversible **[42]**. Dans un intégron la même enzyme qui catalyse l'insertion d'une cassette peut inversement la libérer. Cette cassette peut se voir à nouveau récupérer par un autre intégron. Deux plasmides porteurs d'intégrons ont ainsi la possibilité d'échanger des gènes, et comme les plasmides sont souvent transmissibles d'une cellule à l'autre, on peut voir ici l'un des mécanismes de propagation et de regroupement des facteurs de résistance. Ce mécanisme de base présiderait à l'apparition des résistances multiples aux antibiotiques et autres agents antibactériens. On sait que l'utilisation des antibiotiques à des fins thérapeutiques est devenue une véritable course aux armements où la propagation rapide d'espèces pathogènes résistantes crée une situation préoccupante. Parmi les germes infectieux isolés en milieu hospitalier sont des souches résistantes à une gamme étendue d'antibiotiques, notamment *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Tout porte à croire qu'il s'agit de l'exploitation par le monde microbien d'un dispositif préexistant en réponse à des agressions de toutes sortes.

On ne sait pas encore quelle est l'importance exacte des intégrons dans l'adaptation des bactéries, mais plusieurs niveaux de complexité leur sont connus **[43]**. Il y a trois classes d'intégrons distinguées par les homologies entre gènes d'intégrase.

Les différents types d'intégrase conservent une homologie de séquence (45-58%) qui laisse supposer une divergence évolutive ancienne, certainement bien antérieure à l'utilisation des antibiotiques à des fins thérapeutiques par l'homme. La multiplication des résistances multiples dans les lignées bactériennes pathogènes aurait bénéficié d'un terrain favorable utilisé vraisemblablement lors de la propagation d'autres gènes. Les intégrons ne sont pas mobiles par eux-mêmes, et n'occupent pas une place quelconque sur l'ADN. En fait ils sont souvent associés à des séquences d'insertion appartenant à des transposons ou à des plasmides transmissibles par conjugaison. Il devient alors évident que leur transfert de cellule à cellule, voire entre espèces distinctes, n'en est que facilitée.

Les **intégrons de classe ≥ 1** correspondent *grosso modo* à la structure de base indiqué par la figure, et comportent une zone variable entre deux segments constants. La région conservée comprend classiquement un gène de résistance au bromure d'éthidium (*qacE*), un gène de résistance aux sulfamides (*sul I*) et un gène de fonction non connue (ORF5). La région variable peut ne contenir aucun gène, ou au contraire renfermer à la suite 8-10 gènes de résistance provenant d'autant de cassettes.



Intégron de classe 1

On sait maintenant que les intégrons sont répandus dans les populations bactériennes et que les gènes transportés ne concernent pas uniquement la résistance aux antibiotiques. La dissémination et l'insertion de facteurs métaboliques par intégrons interposés sont des mécanismes plausibles d'adaptation génétique **[44]**. On s'interroge sur l'origine évolutive d'un tel appareil. Le modèle de base que nous avons rencontré, sans gènes nouveaux intégrés, se rencontre dans l'intégron In0 du plasmide pVS1 transporté par *Pseudomonas aeruginosa*. Les gènes conservés (par exemple *sul I*) auraient une origine commune. L'intégron aurait ensuite évolué par apport de nouvelles cassettes[13], et les structures produites auraient été conservées par pression sélective **[45]**.

Les choses se compliquent un peu dans le cas des **intégrons de classe 2**, car ils contiennent des gènes de transposition. Ils font partie du transposon Tn7 et de ses

13 - La plupart des intégrons de ce type descendent d'une version où le gène qacE a été tronqué par l'arrivée du gène de résistance aux sulfamides, sans doute postérieure. On remarque en effet que l'introduction de qacE a pu se produire vers 1920, alors que l'acridine orange était utilisée à des fins thérapeutiques. L'avènement des sulfamides est postérieure (après 1930). L'intégron ainsi constitué est peut-être un ancien transposon, ou le reste d'un phage lysogène.

analogues. On y retrouve les mêmes gènes importés que dans les intégrons de type 1, mais en nombre plus limité. Les gènes de résistance codent pour des enzymes capables d'hydrolyser leur cibles (exemples : bêta-lactamases), de les modifier (cas des aminoglycosides). Parfois ils portent d'autres fonctions. Citons le gène *cmlA* qui détermine une résistance au chloramphénicol par le jeu d'une protéine membranaire qu'on pense être une protéine d'expulsion de l'antibiotique 46. La superposition de la transposition et du mécanisme de propagation de cassettes constitue une redoutable machine de guerre assurant la sélection rapide de formes pathogènes résistantes à une quantité de choses ! On a assisté à une diversification des bêta-lactamases qui hydrolysent les pénicillines. Il en résulte une course aux armements thérapeutiques avec production de nouvelles pénicillines de synthèse. Récemment est apparue une résistance au carbapenem (ou meropenem) et produits similaires par une bêta-lactamase d'un nouveau type. Transporté par plasmide, son gène se propage chez *Serratia* et *Shigella* par intégron interposé, porteur d'une intégrase appartenant à une famille d'un troisième type.

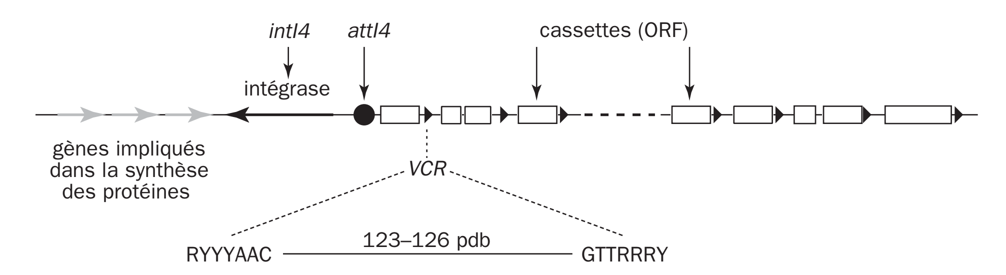
Nous avons remarqué que les intégrases catalysent les allers et retours des gènes entre intégrons et cassettes. À la base de ces échanges se trouvent les segments à 59 bases signalés plus haut, désignés par *attC*. Des séquences homologues de *attC* (de l'ordre d'une centaine de bp, à symétrie imparfaite, et portant aux extrémités GTTRRRY) sont trouvées échelonnées à répétition sur le chromosome de certaines bactéries, et localisées sur ce qui semble être un **prophage**. On pense donc à un vaste intégron qui serait véhiculé par transmission virale. La situation se complique lorsque ces chapelets de gènes peuvent contribuer aussi bien à une adaptation physiologique nouvelle qu'à l'acquisition d'une virulence comme agent pathogène. Nous en arriverons donc à la notion de super-intégron.

Le cas le plus remarquable est celui de *Vibrio cholerae*. Deux sérovars seulement sont les agents du choléra, diarrhée épidémique souvent mortelle. Le genre *Vibrio* héberge de nombreuses espèces bactériennes hétérotrophes dans les océans, les eaux côtières et les estuaires. Leur intervention dans les cycles nutritifs serait considérable en milieu marin **[47]**. Bien qu'elles soient responsables d'invasions infectieuses chez les poissons, les mollusques et les mammifères, leur biologie est incomplètement connue. L'agent du choléra, *V. cholerae*, se maintient en milieu aquatique entre les épidémies, se diversifie en nombreuses souches, passe par des phases de dormance où sa présence est sournoise, et circule avec le zooplancton. Son génome a été entièrement séquencé **[48]**, et l'on espère en obtenir une moisson de renseignements sur l'adaptation génétique et la variabilité en général. Ce génome est constitué de deux ADN circulaires, le chromosome 1 (2961 kb) et le chromosome 2, plus petit (1072 kb). Celui-ci serait peut-être un ancien mégaplasmide acquis au cours de l'histoire très ancienne de l'espèce.

La notion de **super-intégron** a été forgée pour désigner une situation étonnante concernant le chromosome 2. Il renferme une multitude de séquences de 123-126 kb, imparfaitement symétriques et homologues d'une séquence de type "59 bases" du genre *attC*, associée à un intégron de *Pseudomonas*. Ces éléments de séquence sont désignés par *VCR* (ou *Vibrio cholerae repeated sequence*) et alternent avec

des gènes qu'on suppose représenter autant de cassettes insérées dans un énorme intégron **[49]**. Les séquences *VCR* sont reconnues par l'intégrase de type 1 citée antérieurement. Le nombre de ces petites séquences est considérable, supérieur à une centaine, et l'on y rencontre chaque fois le consensus GTTRRRY considéré comme une cible d'intégrase. De bonnes candidates pour recevoir des cassettes ! L'ensemble représente 125 kb, et contient 216 ORF dont les fonctions n'ont pas toutes été déterminées **[50]**. Il y a des facteurs de résistance, une hémagglutinine, une toxine thermostable, une lipoprotéine, des nucléases et méthylases de restriction ainsi que divers facteurs métaboliques. Certaines cassettes sont orientées en sens inverse, d'autres sont présentes en exemplaires multiples. L'une d'elles, de fonction inconnue, a 532 pdb et il en existe 24 exemplaires. Mais la plupart de ces cassettes intégrées ne sont présentes qu'une seule fois et ont la même orientation en amont d'une séquence *VCR*.

Si un tel ensemble est bien un intégron, il est forcément sous la dépendance d'une intégrase. Le gène de celle-ci, *intI4*, a été localisé et présente la même disposition que dans un intégron classique **[51]**. Au voisinage se trouvent aussi un promoteur et un site appelé *attI4*. Tout porte à croire qu'il s'agit d'une énorme machine génétique pour incorporer des cassettes.



Le gène intI4 et les séquences répétées (VCR) chez Vibrio cholerae

Cependant la situation est probablement plus compliquée que dans les intégrons ordinaires, et la transcription d'ensembles aussi grands ne peut se faire qu'au moyen de promoteurs secondaires échelonnés ici et là. Une recherche systématique a révélé que d'autres espèces de *Vibrio*, notamment *V. mimicus* et *V. metschnikovii*, contenaient des séquences *VCR* et des structures comparables. Certaines cassettes se retrouvent chez plusieurs espèces, d'autres sont plus spécifiques.

Pour résumer de façon simplifiée, on peut tirer les conclusions générales suivantes. Les ensembles génétiques interprétés comme des super-intégrons se retrouvent dans une variété d'espèces débordant le cadre de *Vibrio* (*Xanthomonas*, des *Pseudomonas*), mais paraissent provisoirement plus développés chez les espèces pathogènes. Les ORF des cassettes intégrées dans le génome concernent essentiellement des facteurs de défense ou d'adaptation. Leurs fonctions restent souvent obscures, dans la mesure où elles ne peuvent pas encore être déterminées par comparaison avec des séquences de facteurs connus. L'examen des séquences et des intégrases suggère que l'acquisition des super-intégrons est déjà ancienne, bien antérieure à l'ère industrielle et le développement de la chimie

moderne. Les caractéristiques des cassettes sont en faveur d'une acquisition externe. Le mécanisme d'entrée et d'installation de cet ADN étranger reste obscur, mais confère probablement un pouvoir d'adaptation important qui pourrait jouer un grand rôle dans l'environnement et améliorer l'efficacité des bactéries au cours des biodégradations.

Le *Vibrio Cholerae* présente une particularité capitale en rapport avec son caractère infectieux dangereux. Ce sont les **îlots de pathogénécité** (ou *Pais*), dont la nature a déjà été signalée dans ce chapitre. Ils sont indépendants du super-intégron. Ce sont des regroupements considérés comme des apports génétiques extérieurs où les facteurs nécessaires à la virulence forment un seul bloc. La liste des cas répertoriés de ces îlots ne cesse de grandir. Les premiers ont été découverts chez les entérobactéries **[52]** avant d'être observés chez le vibrion **[53]**. Les espèces pathogènes concernent aussi bien les plantes que le règne animal et nous intéressent ici dans la mesure où les mécanismes mis en jeu pourraient expliquer l'adaptation des espèces de l'environnement aux conditions nouvelles. Nous retrouvons encore le principe des transmissions horizontales de l'information génétique, et pas seulement entre bactéries. La dissémination toujours possible de gènes d'une espèce à une autre est apparue soudain comme un phénomène inquiétant mis en avant dans les polémiques concernant les plantes cultivées génétiquement modifiées, et les risques possibles de dispersion intempestive de facteurs génétiques.

Mais, dira-t-on, les super-intégrons sont-ils aussi courants que cela ? La réponse est très probablement oui, au moins chez les bactéries de la famille des vibrions. Le développement de la génomique permet de reconnaître des super-intégrons dans divers groupes de protéobactéries gamma : *Pseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Xanthomonas*, *Photobacterium*, etc. Chaque structure possède son gène d'intégrase *intI* transcrit en sens opposé. Ces intégrases sont spécifiques. On se trouve maintenant devant un grand nombre d'intégrases répertoriées. On en a une preuve convaincante de l'ancienneté des intégrons et super-intégrons en construisant un arbre évolutif à l'aide des séquences *intI* connues, et en le comparant à ceux qu'on peut déjà bâtir avec des marqueurs peu enclins à subir un transfert horizontal, celui de l'ARN 16S et *rplT*, un gène qui code pour la protéine L20 des ribosomes. Les arbres obtenus montrent de fortes ressemblances **[54]**, ce qui montre que leur diversification ne date pas d'hier. Dans le super-intégron de *V. cholerae*, les séquences répétées ou *VCR* sont liées à la spécificité de l'intégrase correspondante. Autres intégrases, autres séquences répétées. La recherche systématique de ces séquences a conduit à une nomenclature conventionnelle (voir *XXR**). Toute répétition de séquence favorise les échanges par recombinaison homologue, ou encore peut conduire à des délétions. Les intégrons ne sont pas essentiels aux transferts de gènes si d'autres mécanismes effectuent ce travail, et semblent ne concerner que des fonctions adaptatives, non pas des fonctions essentielles du métabolisme. Les entérobactéries ont peut-être perdu l'usage des intégrons, conservés dans d'autres groupes. Les rapports fréquents entre super-intégrons et bactériophages restent à expliquer.

Tout ceci montre qu'en introduisant des xénobiotiques dans l'environnement, on offre la possibilité à de nombreux systèmes bactériens de mettre à profit des mécanismes génétiques sophistiqués qui existaient certainement bien avant l'ère industrielle.

2.8 - LA BIOLOGIE PARTICULIÈRE DES BIOFILMS

Un tourbillon d'échanges génétiques permet aux populations bactériennes de s'adapter et de sélectionner ceux de leur membres qui vont perpétuer au mieux l'espèce. Mais les cellules ne sont pas isolées et livrées à elles-mêmes. Elles contractent des associations, échangent des informations et font collaborer leurs métabolismes. On ne peut pas examiner valablement le mécanisme des biodégradations dans la nature sans porter un regard sur ces problèmes.

De très nombreux organismes des milieux aquatiques et terrestres forment des associations attachées à un support, qui peut être une plante ou un élément du sol. Le résultat est un **biofilm**, qui peut se définir comme le développement d'une population de micro-organismes adhérente à un support et consolidée par un ciment commun. La masse des cellules associées peut excéder celle du support, et celui-ci peut à la limite être pratiquement inexistant. Par extension, la notion de biofilm est généralisable à des associations formées en eau libre ou à une interface, notamment dans ce qu'on appelle le floc ou les granules dans les stations d'épuration. Ces regroupements peuvent mettre en contact des champignons, des algues et des protistes et sont cimentées par des substances extracellulaires. Ils contribuent non seulement à former le floc mais à produire des dépôts souvent nuisibles sur la paroi des canalisations.

La formation de biofilms a des conséquences pratiques importantes, qui vont de la détérioration de certaines installations industrielles à des effets pathologiques. L'inclusion des micro-organismes dans un biofilm leur confère une protection contre les antibiotiques et les antiseptiques et tend à rendre leur éradication plus difficile. Les microbiologistes ont constaté que la plupart des espèces microbiennes de l'environnement sont capables de participer à la constitution de biofilms. Différentes espèces se regroupent en sécrétant des polysaccharides extracellulaires qui peuvent former 85% de la masse totale, jusqu'à constituer de formidables cités poly-ethniques, si on peut dire, ou chacun interagit avec les voisins. Il en résulte des avantages physiologiques importants dans le domaine des biodégradations, parce que les cellules échangent des métabolites et peuvent établir un *syntrophisme**. Pour amorcer un biofilm, les bactéries doivent adhérer au support par des structures de surface, les *fimbriae* et *pili* **[55]**. Les entérobactéries (*Salmonella*, *E. coli*) ont aussi des fibres distinctes appelées curlis 56. Ces structures se lient à des protéines faisant partie du ciment entre cellules. Les bactéries mobiles par flagelles comme *Pseudomonas aeruginosa*, migrent à la surface du support à la recherche d'un terrain favorable. Les cellules se déposent et tendent éventuellement à migrer les unes vers les autres en émettant des curlis et des

filaments protéiques rétractiles appelés pili de type IV qui les aident à se regrouper. L'adhésion doit vaincre les forces électrostatiques répulsives entre leur surface communément anionique et les nombreux matériaux porteurs de charges négatives. Les polymères extracellulaires contribuent à réduire ces forces contraires. L'adhésion ou adhérence peut être passive ou active. Dans l'adhérence passive, les bactéries ont déjà des propriétés de surface qui permettent leur attachement immédiat. Dans l'adhérence active au contraire, les bactéries sont attirées par des forces de VAN DER WAALS ou autres mais ne s'attachent pas aussitôt très solidement. Une faible agitation du milieu (ou le mouvement des flagelles) suffit à les détacher réversiblement. L'adhérence active devient efficace dans une deuxième phase où l'attachement prend un caractère irréversible et obéit à un mécanisme complexe fondé sur un changement des propriétés de la surface cellulaire. Ce résultat dépend de l'expression d'un ensemble de gènes et rappelle le phénomène de différenciation des cellules qu'on voit dans les tissus animaux et végétaux. Ce phénomène a été bien mis en évidence à l'aide de *Pseudomonas* marins sur des surfaces de polystyrène **[57]**. Certaines espèces comme les *Planctomyces** ont un cycle d'alternance entre stade mobile et stade fixé.

On peut voir la fixation des bactéries et la fabrication d'un biofilm comme la réponse à un état de stress. Le biofilm une fois formé est un havre de protection contre des conditions adverses présentes en milieu libre. Les surfaces colonisées, qu'il s'agisse de verre, de silicates, de plastiques, de bois ou autres, ne sont jamais absolument "propres", mais rapidement tapissées par de fins dépôts de molécules organiques. Celles-ci sont reconnues par la surface des bactéries. Un éclairage intéressant a été apporté par un groupe lyonnais (P. LEJEUNE à l'INSA) opérant sur le colibacille **[58].** Dans les cultures en milieu libre de *E. coli* K12, dépourvu de tendance à se fixer, apparaissent progressivement des colonies sur les parois de verre ou de plastique. Ces biofilms sont formés de cellules qui ont subi une mutation. L'étude a montré que celle-ci a eu lieu dans **OmpR**, une protéine de contrôle pour laquelle des explications sont données en glossaire. Elle est un peu la gardienne des conditions extérieures comme la pression osmotique, l'agent de contrôle de la synthèse des porines et d'autres facteurs. Dans le colibacille K12 libre, OmpR entrave la formation des curlis et c'est pourquoi sa modification par une mutation ponctuelle lève l'inhibition et encourage la préparation d'un biofilm. La protéine OmpR fait partie d'une large gamme de régulateurs dont nous trouverons des exemples dans les autres chapitres. Le principe de base est presque toujours celui-ci. Une protéine détecte une situation et sert de capteur. Elle modifie une protéine régulatrice qui intervient sur la transcription d'une série de gènes, donc sur leur expression. OmpR transmet son signal dans plusieurs direction. Dans le cas de l'adhésion, la seconde protéine régulatrice est **RpoS**. Celui-ci a une action multiple dont la philosophie générale est d'accroître la résistance des cellules, et c'est bien ce qui se passe quand elles forment un biofilm, la formation des curlis étant encouragée par RpoS quand OmpR lui en a donné l'ordre.

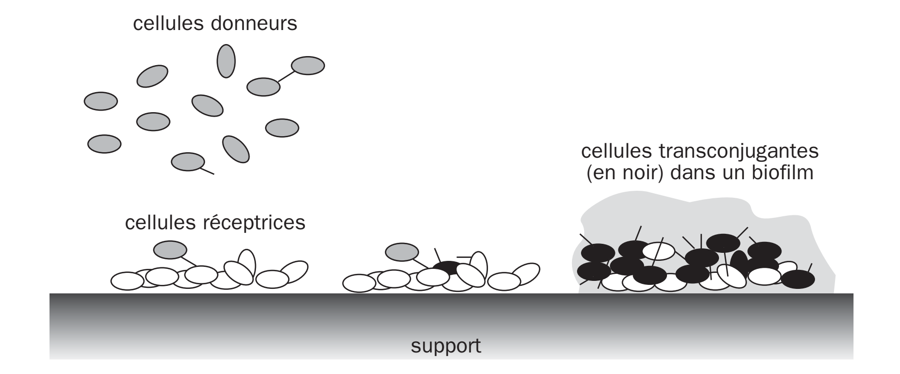
Quels sont les signaux perçus pour l'installation d'un biofilm ? Il y en a plusieurs. On a pu montrer que certaines bactéries perçoivent un contact comme un signal qui va les inciter à passer du stade de nageuses libres à la formation d'un édifice multicellulaire. Un autre signal est le stress déclenché par une surpopulation. Les

cellules communiquent entre elles par émission de substances fonctionnant un peu à la manière des hormones (*quorum-sensing signals*) et reconnues par des récepteurs de surface. Les molécules de signalisation sont du type acylhomosérine-lactone 59. Elles sont produites en continu par les cellules, traversent la membrane et s'accumulent dans le milieu où leur taux est jaugé par les cellules individuelles. Au-dessus d'un certain seuil d'intensité du signal sont induits des gènes qui commandent une réponse à la surpopulation. La formation d'un biofilm fait partie de ces réponses qui peuvent prendre plusieurs formes selon les espèces. Chez *Ps. aeruginosa*, l'induction du gène *algC* commande l'élaboration dans le biofilm du principal polymère de la matrice, qui est l'alginate. Le démarrage d'un biofilm est donc une affaire complexe dont on a pu montrer qu'il était sous la dépendance d'une modification du taux d'expression d'un grand nombre de gènes **[60]**. Cette question a des prolongements assez graves quand il s'agit d'espèces pathogènes dont le pouvoir infectieux est piloté en grande partie par un état de stress. La sécrétion de toxines est l'une de ces réactions adaptatives en réponse à un déficit en fer ou en nutriments, ainsi qu'aux réactions de défense de l'hôte. Un aspect fascinant des relations entre les cellules est l'existence de signaux capables de détecter la proximité de cellules étrangères. Une bactérie individuelle serait capable distinguer les signaux émanés de la même espèce de ceux des autres **[61]**. L'emploi de substances analogues capables de flouer ces mécanismes de reconnaissance pourraient servir d'outils pour lutter contre la formation de biofilms partout où leur présence crée des problèmes.

Un biofilm n'est pas un milieu homogène. Au sein des biofilms peuvent se concentrer des relations physiologiques complexes entre espèces. Par exemple la biodégradation de l'alcool benzylique par *Acinetobacter* peut associer celui-ci à *Pseudomonas putida* qui consomme l'acide benzoïque produit par le premier et l'en débarrasse. D'importantes différences de conditions physiologiques existent dans la masse du biofilm. Les couches les plus profondes proches du support sont beaucoup plus pauvres en oxygène que les couches superficielles. Des mesures par micro-électrode ont montré que la teneur en O_2 peut varier sur des distances extrêmement courtes, de moins d'un dixième de millimètre. Les bactéries sont organisées au sein de la matrice sous forme de microcolonies parcourues par de minuscules veines de liquide assurant le transport des nutriments. Enfin chaque biofilm apparaît comme un monde où ses occupants ne restent pas à des emplacements figés, mais migrent au sein de la masse et en échange avec l'extérieur selon des règles encore mal cernées. L'effet protecteur exercé sur les cellules au sein d'un biofilm a des conséquences importantes **[62]**. Les substances antibiotiques doivent diffuser dans la matrice compacte et leur concentration en profondeur est plus faible qu'à la surface. Leur efficacité est réduite d'autant. Dans le cas des pénicillines, il peut arriver que le biofilm contienne des germes comme les staphylocoques, détenteurs d'une bêta-lactamase. L'antibiotique est alors détruit plus rapidement avant d'atteindre les couches profondes du biofilm. En outre ces antibiotiques n'ont que peu d'action sur les cellules des couches profondes qui ont cessé de se diviser. Les cellules qui ne se divisent pas ou sont fatiguées gardent leur vieille paroi en l'état et ne sont pas inquiétées. Elles restent insensibles à l'antibiotique tant qu'elles ne font pas de nouvelle paroi.

L'antibiotique reste alors sans effet sur les couches profondes du biofilm. Un effet protecteur existe aussi pour les antiseptiques, qui doivent neutraliser progressivement les différentes couches du biofilm avant d'accéder à certaines cellules [63].

La formation d'un biofilm offre des facteurs favorables aux **échanges génétiques** entre cellules. On a pu montrer que la présence de plasmides et la conjugaison cellulaire induisent le développement de tels rassemblements [64]. Pourquoi ? La conjugaison bactérienne est un moteur efficace de la transmission horizontale de gènes, en particulier de ceux qui autorisent une biodégradation. Autant dire qu'elle facilite l'adaptation d'une population entière à s'attaquer à de nouveaux substrats. Inversement la conjugaison ne peut avoir lieu qu'au hasard de la rencontre entre cellules partenaires. Sa probabilité est faible dans une population diluée. La propagation d'un plasmide est au contraire beaucoup plus facile quand les cellules sont en contact les unes avec les autres. Comme les plasmides codent communément pour des adhésines et pili, l'induction des gènes responsables ne fait que renforcer le pouvoir conjugatif et l'adhésion des cellules les unes aux autres.



Le dessin en évoque le principe. La conjugaison à partir d'un donneur entraîne la propagation du plasmide et des facteurs qui lui sont liés. Les transconjugants expriment les propriétés qui permettent au biofilm de se consolider, en particulier la production de polysaccharides. En même temps ces transconjugants acquièrent le pouvoir de fabriquer de nouvelles enzymes dont les gènes sont portés par le plasmide. On peut voir que cette question a de profondes répercussions sur la compréhension de certains mécanismes environnementaux. Les micro-organismes, très souvent associés sur des particules solides, notamment dans les sols, forment de véritables cités multicellulaires où s'établissent des échanges génétiques ainsi que des relations métaboliques complexes. C'est pourquoi les recherches sur les biofilms ont pris depuis quelques années une importance de premier plan, en particulier pour mieux comprendre et piloter certaines biodégradations.

L'immobilisation artificielle des cellules sur un support permet d'exploiter les propriétés spéciales constatées dans les biofilms. L'avantage des bactéries immobilisées est souvent leur meilleure résistance aux conditions adverses. On a décrit de nombreuses techniques d'immobilisation, qui consistent notamment à

inclure les cellules dans un gel, ou à créer des ponts covalents entre les constituants de la surface cellulaire et le support. Il est éventuellement question de reproduire de façon contrôlée les propriétés constatées dans le **floc** des stations d'épuration. La formation de ces flocs est une opération tout à fait essentielle du traitement des eaux usées. Elle est assurée par des bactéries floculantes qui s'agrègent entre elles pour donner des assemblages qui sont à la base des boues. Ces flocs sédimentent et se concentrent au cours de la phase de décantation, en entraînant des matières organiques, des phosphates, etc. Parmi les bactéries floculantes sont des nitrifiantes, qui jouent un rôle clé dans l'oxydation de l'ammoniac en nitrite puis en nitrate. La structure des flocs est encore imparfaitement comprise. Des recherches sont faites pour améliorer leur efficacité et permettre une meilleure diffusion des substances dissoutes dans la masse des particules. La décantation des flocs est parfois perturbée par le développement de bactéries filamenteuses, dont *Microthrix parvicella* et *Sphaerotilus natans*, qui perturbent le bon fonctionnement des stations d'épuration. La gestion de ces problèmes est évidemment un challenge important, avec l'extension du volume de déchets et des pollutions de toute nature.

2.9 - COMMUNICATION ET BIOLUMINESCENCE

Cette section prolonge la précédente car les bactéries peuvent échanger des renseignements à l'aide des substances qu'elles émettent au sein du milieu. Les interactions par phéromones sont nombreuses et peuvent avoir une influence ici et là sur la répartition de la microflore et son activité dans l'environnement. La communication est importante pour la survie des espèces quand il s'agit de lutter contre une surpopulation, un déficit en ressources, une agression, ou lorsqu'il faut mettre en commun des outils de dégradation pour améliorer leur efficacité. Ce sujet est devenu extrêmement important pour comprendre le comportement des populations bactériennes.

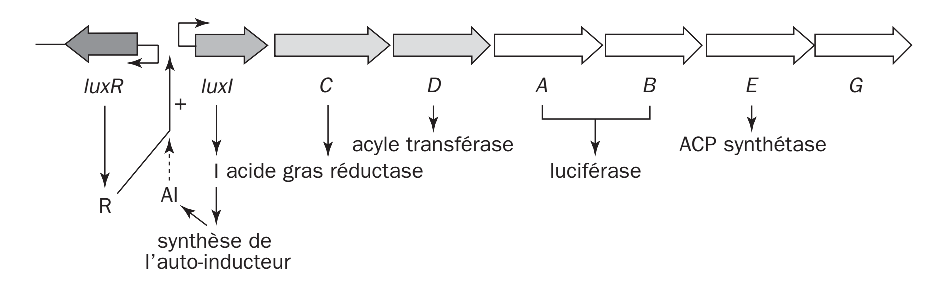
3 hydroxy-octanoyl-homosérine-lactone

Les premières phéromones bactériennes connues sont les N-acyl-L-homosérine-lactones ou **AHLs**, dont il existe toute une famille chez les Gram-négatifs en fonction de la nature de leur formule. Une même espèce peut libérer dans le milieu plusieurs AHLs reconnues par différentes protéines réceptrices.

Les AHLs sont typiquement des signaux indiquant une forte concentration cellulaire. Leur spécificité est déterminée par la longueur de la chaîne carbonée et la nature de la position 3, qui est soit un alcool secondaire comme ici, soit une fonction cétonique. Ces produits sont hydrophobes et traversent facilement la membrane. Lorsque les bactéries se multiplient en milieu confiné, la concentration des AHLs augmente. À partir d'un certain seuil, variable de 10^{-5} à 10^{-9} M selon les cas, des

régulateurs de transcription sont activés spécifiquement, provoquant l'expression d'un ou plusieurs gènes groupés en opérons. Le phénomène est ce qu'on appelle le ***quorum sensing*** **[65]** en somme le résultat d'un effet de foule. Il conduit à une sorte d'état de crise dans la population bactérienne, et peut se manifester dans les espèces pathogènes par un accroissement de la virulence.

La bioluminescence de *Photobacterium fischeri* a permis de se faire une première idée sur l'effet de foule. Cette espèce océanique émet de la lumière grâce à une oxydase flavinique agissant sur des composés aldéhydiques à longue chaîne (de 7 à 11 carbones) appelés ***luciférines****. L'émission de lumière résulte de leur oxydation. Cette question est mentionnée ici essentiellement pour sa valeur en tant que modèle. L'accumulation des bactéries dans des organes spéciaux appartenant à certains poissons et céphalopodes crée le confinement et provoque l'augmentation de la lumière émise. La régulation de ce système a stimulé l'étude de divers phénomènes biologiques qui ne se limitent pas à l'émission de lumière et concernent les biodégradations. La bioluminescence est fondée sur une structure génétique qui nous servira d'illustration du phénomène. La lumière est émise à condition que soient exprimés les gènes *luxA* et *B* codant pour une luciférase [14], et les gènes *luxC*, *D* et *E* codant pour trois protéines contribuant à la synthèse à partir d'une luciférine, qui est ici un aldéhyde.



Opéron lux de Vibrio fischeri

Le gène *luxG* coderait pour une flavine réductase **[66]**. Quant à la protéine codée par *luxI*, elle participe à la synthèse d'un inducteur interne ou **auto-inducteur** (**AI**), un produit du type N-acylhomosérine lactone qui diffuse et s'accumule au dehors de la cellule

L'expression de l'opéron des gènes *lux* est sous la dépendance de la protéine régulatrice **LuxR** et de **LuxI**, enzyme impliquée dans la synthèse de l'auto-inducteur AI. LuxR est un activateur de transcription pour son propre gène et pour cet opéron *luxICDABEG*. Le gène régulateur *luxR* et l'opéron sont transcrits dans des directions opposées à partir d'une même région promotrice, une disposition que nous retrouverons souvent. L'auto-inducteur est présent en quantité infime dans les cellules isolées mais commande sa propre production. Il en résulte un effet amplificateur. Quand la population cellulaire devient dense, par exemple dans les organes lumineux des calmars, sa concentration s'accroît dans des proportions énormes.

---

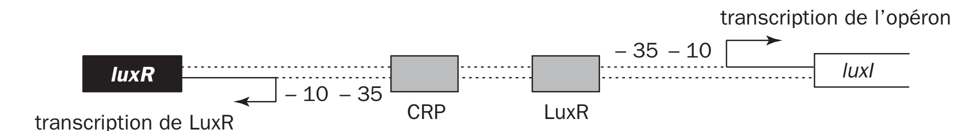
14 - Le principe est expliqué en glossaire à Luciférine.

LuxR est fixée à la membrane et fonctionne comme dimère. La protéine peut se lier à l'ADN par le domaine C-terminal de chaque monomère sur une séquence palindromique appelée "boîte lux" dans la région du promoteur. L'association ne se fait pas en temps normal, parce que la partie N-terminale de la séquence recouvre dans la même molécule la partie C-terminale responsable de l'attachement. La région N-terminale fait office de couvercle qui empêche l'attachement et entraîne une inhibition interne. Ce blocage cesse quand l'auto-inducteur AI se fixe sur cette région de LuxR, provoque un changement de conformation, et dévoile la partie qui doit s'attacher à l'ADN. Chez *Vibrio fischeri*, c'est donc AI qui fait sauter le bouchon. L'association formée entre LuxR et AI est le véritable activateur transcriptionnel. Il fait deux choses : déclencher l'expression de l'opéron, et accélérer celle du gène *luxR*. Ceci est réalisé à une condition expresse qui est l'aide d'une protéine supplémentaire appelée **CRP** * **[67]**.

La protéine CRP (ou CAP) est un activateur de transcription supplémentaire agissant comme pour divers sites génétiques lorsqu'elle a lié de l'AMP cyclique (AMPc). Son attachement sur l'ADN ne se fait que si le taux d'AMPc est suffisant. Ce taux baisse en milieu glucosé, avec pour effet une diminution de la bioluminescence. Le maximum de lumière émise s'observe donc :

- quand l'acylhomosérine-lactone (AI) se lie à LuxR ;
- quand le tandem LuxR + AI se lie à l'ADN ;
- quand le régulateur CRP se lie également à l'ADN à partir d'un taux suffisant d'AMPc.

Un diagramme montre la zone cruciale de 240 kb où se fait la régulation chez *V. fischeri*. Sont indiqués les deux promoteurs (caractérisés chacun par les boîtes – 10 et – 35, les boîtes où s'installent CRP et LuxR (*lux*), et les points de départ des transcriptions (flèches).



La zone régulatrice sur l'ADN

Ce système ne peut fonctionner que s'il y a en permanence assez d'auto-inducteur AI pour activer la protéine LuxR. L'auto-inducteur AI est apporté de l'extérieur par les autres cellules de la colonie et il y a en même temps une petite transcription de fuite de l'opéron *luxICDABEG*, de telle sorte que AI est produit en permanence mais au ralenti. L'ensemble de la population fabrique donc de l'auto-inducteur en continu et c'est pourquoi il tend à s'accumuler progressivement. La brusque accélération se fait au-delà d'un certain niveau avec l'entrée en lice du régulateur LuxR et la formation du complexe activateur avec AI.

L'activation produite par la montée de l'auto-inducteur AI devrait avoir une allure explosive, avec expression massive des gènes concernés. Il n'en est rien, car un mécanisme secondaire en limite les excès. Quand le complexe LuxR-AI s'accumule, il tend à se limiter lui-même, car la protéine inhibe alors l'expression de son gène *luxR*. Elle limite elle-même sa propre production ! C'est donc une boucle de rétro-

contrôle. D'autres mécanismes assez compliqués semblent intervenir. *Vibrio fischeri* ne fait pas qu'un seul AI mais trois, AI-1, AI-2 et AI-3, qui diffèrent par leur chaîne latérale. AI-1 et AI-3 sont des acylhomosérine-lactones ou AHL, fabriqués par la même enzyme, alors qu'AI-2 est produit par une voie indépendante. Tous ces composés dérivent du même précurseur métabolique, qui est la *S-adénosyl-méthionine**. Or AI-2 n'active que faiblement LuxR. Il entre en compétition avec les autres AI et se comporte en fait comme un inhibiteur **[68]**. Il y a donc un jeu subtil entre tous ces facteurs, et un réglage sophistiqué qui peut éclairer, c'est le cas de la dire, d'autres régulations bactériennes du même genre.

Des variantes de ce mécanisme s'observent en fonction des espèces. Opèrent-elles de la même façon ? Le vibrion *V. harveyi* produit et reçoit deux auto-inducteurs, désignés par AI-1 et AI-2, mais distincts de ceux de *V. fischeri*. Ces deux produits régulent l'opéron de la luminescence, mais la situation repose sur une cascade de protéines régulatrices un peu plus compliquées. Les deux auto-inducteurs sont reconnus par des récepteurs différents LuxN et LuxQ, et les signaux sont intégrés par une même protéine régulatrice. Nous ne décrirons pas cette cascade ici, mais on pourra en trouver les détails dans les articles de FREEMAN et BASSLER **[69]**. L'auto-inducteur AI-1 de *V. Harveyi* est une homosérine lactone spécifique de l'espèce. Par contre AI-2 est fabriqué par de nombreuses espèces, y compris le colibacille et les salmonelles. On a identifié l'enzyme catalysant la dernière étape de la synthèse de AI-2 et baptisée **LuxS**. Cette question est exemplaire car la connaissance du gène *luxS* permet de faire une recherche systématique de ce type de facteur dans les populations bactériennes. Il a été constaté avec surprise que des gènes fortement homologues de *luxS* sont très répandus dans la nature. La conclusion logique est que AI-2 représente un signal interspécifique du *quorum sensing*, échangé au sein des populations mixtes. La révélation de la nature exacte de AI-2 a été une surprise. Cet auto-inducteur contiendrait du **bore [70]**. Ce détail est souligné ici pour la curiosité. Le bore, apporté en général sous forme de borate, est nécessaire à de nombreux organismes, mais il est très rare de lui attribuer une fonction précise. Or l'AI-2 fait maintenant figure de signal bactérien universel compris par un grand nombre d'espèces **[71]**.

S-adénosyl-méthionine → → LuxS → 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione → précurseur de A1-2 → $B(OH)_4^-$ → **AI-2**

Le bore dans un signal universel ?

Les deux auto-inducteurs de *Vibrio harveyi* représentent peut-être une situation très répandue. Un premier signal de surpopulation, AI-1, est réservé à l'espèce concernée. Le second, AI-2, s'échange entre bactéries d'espèces différentes. On pense que de tels échanges d'information ont lieu au sein des populations mixtes responsables de biodégradations dans l'environnement. Le quorum sensing ou effet de

foule ne gouverne pas qu'une fonction physiologique, mais peut moduler les effets d'une protéine régulatrice qui exerce son action sur des activités divergentes commandées par des opérons différents **[72]**. Ces derniers forment ce qu'on appelle un *régulon**. De nombreuses activités physiologiques sont modulées par la concentration bactérienne. Le tableau en cite quelques uns.

Espèce bactérienne	*Activité stimulée par une AHL*
Photobacterium fischeri, Vibrio harveyi	Émission de lumière
Pseudomonas aeruginosa	Induction de l'élastase et de facteurs de virulence
Pseudomonas aureofaciens	Induction de phénazines antibiotiques
Erwinia carotovora	Induction d'enzymes lytiques et de carbapenem
Agrobacterium tumefaciens	Induction du transfert de plasmide Ti entre cellules
Serratia marcescens	Changement de mobilité, swarming
Yersinia enterocolitica	Induction de protéines non caractérisées

Les N-acylhomosérine-lactones (NAHs) ne sont pas les seuls agents de communication du monde bactérien. Chez les *Streptomyces* comme *S. griseus*, le signal se transmet par un produit un peu plus simple, la gamma-butyrolactone. Le résultat est une tendance à émettre des antibiotiques ou à sporuler. Les Gram-positifs ont souvent des mécanismes particuliers qui mettent en jeu des oligopeptides de 5 à 25 acides aminés (dont certains sont modifiés par rapport aux formules classiques). Voici quelques exemples. Dans le cas de *B. subtilis*, les effets constatés sont déclenchés par plusieurs peptides.

Espèce bactérienne	*Activité stimulée par un peptide*
Bacillus subtilis	Compétence à la transformation
Bacillus subtilis	Sporulation
Lactococcus lactis	Production de nisine (lantibiotique)
Lactobacillus plantarum	Production de plantaricine (antimicrobien)
Lactobacillus sake	Production de sakacine (antimicrobien)
Enterococcus faecalis	Agglutination, transfert de plasmide
Staphylococcus aureus	Exotoxine, virulence...

Bacillus subtilis est l'archétype des bactéries sporulantes répandues dans l'environnement, et offre un cas de figure complexe. La densité de population favorise à la fois la compétence (voir *transformation**) et la sporulation. La compétence est stimulée par deux facteurs extracellulaires, la phéromone ComX (un décapeptide), et CSF, un pentapeptide qui agit également sur la sporulation **[73]**. Dans les deux cas, il s'agit d'une réponse qui intègre plusieurs situations adverses comme un déficit de ressources nutritives, des atteintes à l'intégrité de l'ADN (la transformation est un moyen de réparer), une atteinte toxique ou l'inhibition d'une étape du métabolisme. Les signaux sont pris en charge par une perméase (SpoK) et par le récepteur de CSF. Leur action débouche en fin de compte sur des régulateurs de transcription, soit ComK pour la compétence, et SpoA pour la sporulation. Un jeu

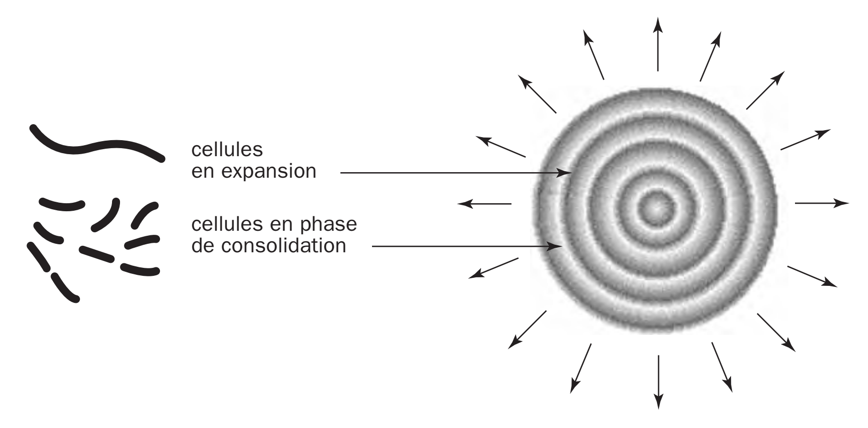
complexe entre les différentes régulations oriente le comportement des cellules. Il déclenche ou inhibe la sporulation. Chez les Gram-positifs, ces polypeptides sont généralement fabriqués sous forme de chaînes plus longues, dont une partie est éliminée par une coupure hydrolytique. La partie restante est alors prise en charge et exportée dans le milieu par un *transporteur ABC**, avant d'être reconnue par une autre cellule qui se sert d'un récepteur approprié. Ce dernier peut faire partie d'une *régulation à deux composants** avec capteur et régulateur. D'autres agents de communication sont des acides gras, des macrolides (antibiotiques de *Streptomyces alboniger*) et autres produits. Ces communications sont nombreuses et très diverses chez les actinomycètes et organismes capables de faire des filaments mycéliens aériens et des fructifications.

Un des aspects les plus intéressants des communications entre bactéries est l'existence d'une organisation collective, qu'on a souvent comparée au développement des organismes pluricellulaires. Ceci avait été remarqué par l'examen des colonies *d'Escherichia coli* sur boîte gélosée **[74]**. La règle qui gouverne l'organisation de la colonie semble être d'augmenter au maximum les contacts de cellule à cellule, avec des différences sur l'élongation et la mobilité des cellules individuelles. Le point le plus important est peut-être la sécrétion des polysaccharides extracellulaires formant une matrice dans laquelle la population s'organise. C'est exactement ce qu'on observe dans un biofilm, et probablement un facteur majeur qui règle le développement des populations denses de micro-organismes dans l'environnement. Une application spectaculaire est le ***swarming***. Certaines espèces, comme *Proteus vulgaris* et *P. mirabilis*, ont la propriété bien connue des microbiologistes de s'étaler très rapidement sur boîte gélosée. Là encore cette question est évoquée par sa valeur comme modèle. Il y a division du travail entre des cellules allongées et hyperflagellées, qui se migrent dans une matrice de polysaccharides externes, et des cellules nageuses qui ne sont mobiles qu'en milieu liquide. Ce comportement est collectif, dépend de certains facteurs du milieu[15] et ne survient qu'au sein d'une population nombreuse. Une périodicité très curieuse peut s'établir, avec des zones d'étalement et des alternances de swarming et de repos **[75]**. Une colonie de *Proteus mirabilis* s'établit en cercles concentriques, faisant alterner une phase de swarming (expansion), et une phase de consolidation où les cellules se divisent activement.

Les cellules oscillent donc entre deux phases, où les cellules en expansion ont une forme beaucoup plus allongée et se déplacent dans un film de polymère, formant une zone dense poussée par la prolifération des bactéries en phase de consolidation, situées en zones plus claires. Ces bactéries en voie de division se sont dédifférenciées à partir des cellules essaimeuses ou *swarming cells*. Elles se différencieront à nouveau en cellules essaimeuses. L'anneau le plus externe en contient. La prolifération des bactéries dans le cercle interne adjacent crée une pression qui tend à agrandir le cercle, indépendamment des mouvements des cellules essaimeuses.

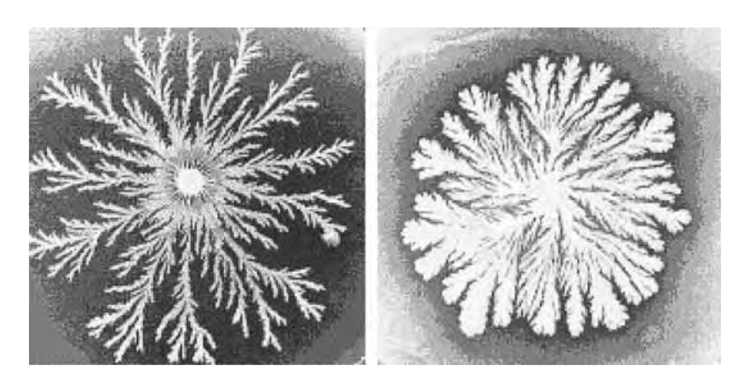
---

15 - Le swarming complique l'obtention de colonies isolées sur gélose, peut s'inhiber en utilisant un agar plus concentré ou en ajoutant du désoxycholate.



Colonie de Proteus mirabilis

Celles-ci cessent leur migration et entrent en consolidation, préparant un nouveau cercle de cellules végétatives à division rapide, avant que s'établisse une nouvelle vague de bactéries essaimeuses. Le plus étrange est la synchronisation du mécanisme dans toute la colonie, qui suppose l'existence d'un programme bien défini et de communications intercellulaires qui demandent encore à êtres élucidées. Des morphologies différentes sont adoptées par les colonies de *Bacillus subtilis* en cours de croissance sur milieu solide et semblent avoir intéressé particulièrement les physiciens à cause des figures formées évoquant les fractales.



Croissance fractale : Bacillus subtilis sur agar

Les dendrites apparaissent généralement sur un milieu carencé en éléments nutritifs et concentré en agar. La formation de dendrites permet à la colonie d'augmenter sa surface de contact avec le milieu neuf et de faciliter la diffusion interne des ressources. Les dendrites avancent quand la masse cellulaire pousse devant elle la gangue d'exopolymères **[76]**. Les figures formées ont donné lieu à de nombreuses modélisations mathématiques.

Cet exemple nous permettra de conclure sur l'importance des associations bactériennes réglées par des messages chimiques entre cellules et entre espèces différentes, avec à la clé des bénéfices adaptatifs importants. On peut en citer

quelques-uns. L'un d'eux est la division du travail. On l'observe par la différenciation de cellules spécialisées, très marquée chez les actinomycètes ou chez les cyanobactéries (hétérocystes). Un autre avantage est l'utilisation commune d'une source nutritive qui n'est pas suffisamment accessible aux cellules isolées. Dans la plupart des cas, il s'agit de la fabrication d'enzymes lytiques extracellulaires. Chez une espèce parasite des végétaux, *Erwinia carotovora*, la sécrétion d'enzymes attaquant les parois végétales est sous le contrôle d'un quorum sensing par phéromone (une AHL) et n'intervient donc qu'à partir d'un certain volume de la population. Le regroupement des cellules est un mécanisme de défense et peut induire la sécrétion d'antibiotiques ou augmenter la résistance à des agents extérieurs, comme les peroxydes. C'est un phénomène qu'on observe aussi dans les biofilms, ou dans les cellules immobilisées artificiellement. La sporulation est une réponse qui apparaît comme une réaction de secours pour la population entière. Enfin le regroupement favorise les échanges génétiques par conjugaison, transformation, pénétration de plasmides. On pense que ces échanges génétiques ont une importance écologique capitale en favorisant l'adaptation des populations aux biodégradations. Certains auteurs voient une population bactérienne comme une sorte d'organisme multicellulaire où le patrimoine de chaque individu reste accessible à tous les individus de la collectivité **[77]**.

Les bactéries et les procaryotes en général ne sont donc pas faits uniquement de cellules isolées qui vivent pour leur propre compte, mais s'associent temporairement ou en permanence à des ensembles plus grands où s'établissent échanges et communications entre individus. Des niveaux d'association complexes, sièges de diverses différenciations, sont atteints par les *myxobactéries**, et surtout par les nombreux actinomycètes du sol qui forment un mycélium et des fructifications, en imitant la structure plus complexe des champignons.

CONCLUSION RAPIDE

Le monde des micro-organismes qui prennent part aux grands cycles des substances naturelles et artificielles de l'environnement a une énorme plasticité d'adaptation. En se limitant aux bactéries, nous avons déjà pu voir que des mécanismes diversifiés peuvent remanier leur patrimoine génétique et faire naître dans une population des cellules rendues plus aptes à gérer leur métabolisme ou leur résistance face à des conditions nouvelles. Les modifications vont de la mutation ponctuelle banale survenant au hasard à des bouleversements plus grands par la transmission de matériel génétique de cellule à cellule. Dans la compétition vitale l'agressivité et les hautes performances sont de règle. Le pouvoir infectieux des bactéries pathogènes est un aspect particulier de ce comportement, qui peut nous donner des indications sur des mécanismes plus généraux allant jusqu'à l'apparition de nouvelles formes aptes à effectuer des biodégradations.

RÉFÉRENCES

[1] STOVER CK & COLL. (2000) *Nature* **406** : 959-964.

[2] HERRMANN R & REINER B (1998) *Curr. Opin. Microbiol.* **1** : 572-579.

[3] COOPER VS & LENSKI RE (2000) *Nature* **407** : 736-739.

[4] PAPADOPOULOS D, SCHNEIDER D, MEIER-EISS J, ARBER W, LENSKI RE & BLOT M (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** : 3807-3812.

[5] OBMOLOVA G, BAN C, HSEIH P & YANG W (2000) *Nature* **407** : 703-710 ;
LAMERS MH, PERRAKIS A, ENZLIN JH, WINTERWERP HHK, DE WIND N & SIWMA TK (2000) *Nature* **407** : 711-717.

[6] BAN C, JUNOP M & YANG W(1999) *Cell* **97** : 85-97.

[7] BAN C & YANG W (1998) *EMBO J.* **17** : 1526-1534.

[8] UETZ P & 18 auteurs (2000) *Nature* **403** : 623-627 et annexe.

[9] PUIG O, CASPARY F, RIGAUT G, RUTZ B, BOUVERET E, BRAGADO-NILSSON E, WILM M & SERAPHIN B (2001) *Methods* **24** : 218-229.

[10] GAVIN A-C & 37 auteurs (2002) *Nature* **415** : 141-147.

[11] HO Y & 45 auteurs (2002) *Nature* **415** : 180-183.

[12] ELLIS RJ (2001) *Trends Biochem.Sci.* **26** : 597-604.

[13] DAVIES J (1996) *Microbiologia* **12** : 9-16.

[14] OCHMAN H, LAWRENCE JG & GROISMAN EA (2000) *Nature* **405** : 299-304.

[15] BLATTNER FR & autres auteurs (1997) *Science* **277** : 1453-1474.

[16] LAWRENCE JG & OCHMAN H (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95** : 9413-9417.

[17] SMITH HO, TOMB JF, DOUGHERTY BA, FLEISCHMANN RD & VENTER JC (1995) *Science* **269** : 468-470.

[18] MAURELLI AT, FERNANDEZ RE, BLOCH CA & RODE CKv FASANO A (1998) *Proc. Natl. Acad.Sci.* **95** : 3943-3948.

[19 DOBRINDT U & REIDL J (2000) *Int. J. Med. Microbiol*. **290** : 519-527.

[20] NELSON KE & COLL. (1999) *Nature* **399** : 323-329 ;
LOGSDON JM & FUGUY DM (1999) *Curr. Biol*. **9** : R747-R751.

[21] KUNST F & 25 autres auteurs (1997) *Nature* **390** : 237-238.

[22] HEINEMANN JA & SPRAGUE GFJ (1989) *Nature* **340** : 205-209.

[23] STACHEL SE & ZAMBRYSKI P (1986) *Cell* **47** : 155-157.

[24] WILLETTS N & SKURRAY R (1987) *In "Escherichia coli and Salmonella typhimurium"*, NEIDHARDT FC ed., Amer. Soc. Microbiol., Washington : 1110-1133.

[25] CHRISTIE PJ (2001) *Mol. Microbiol.* **40** : 294-305.

[26] CHRISTIE PJ (2001) *Mol. Microbiol.* **40** : 294-305.

[27] BERG DE & HOWE MM (1989) *Mobile DNA, American Soc. For Microbiology, Washington, D.C.*

[28] MAHILLON J &CHANDLER M (1998) *Microbiol. Molec. Biol. Reviews* **62** : 725-774.

[29] MACHIDA C & MACHIDA Y (1989) *J. Mol. Biol.* **208** : 567-574.

[30] ESCOUBAS JM, PRERE MF, FAYET O, SALVIGNOL I, GALAS D, ZERBIB D & CHANDLER M (1991) *EMBO J.* **10** : 705-712 ;
FARABAUGH PJ (1996) *Microbiol. Rev*, **60** : 103-134.

[31] POLARD P & CHANDLER M (1995) *Genes Dev.* **9** : 2846-2858 ;
POLARD P & CHANDLER M (1995) *Mol. Microbiol.* **125** : 13-23.

[32] BLOT M (1994) *Genetica* **93** : 5-12.

[33] COOPER VS, SCHNEIDER D, BLOT M & LENSKI RE (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 2834-2841.

[34] COX R & MIRKIN SM (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** : 5237-5242.

[35] LAWLEY TD, BURLAND V & TAYLOR DE (2000) *Plasmid* **43** : 235-239.

[36] KLECKNER (1990) *Annu.Rev.Genetics* **124** : 449-454 ;
KLECKNER N (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* **6** : 297-327.

[37] DE LA CRUZ NB, WEINREICH MD, WIEGAND TW, KREBS MP, REZNIKOFF WS (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 6932-6938.

[38] STOKES HW & HALL RM (1989) *Mol. Microbiol.* **3** : 1669-1683.

[39] OCHMAN H, LAWRENCE JG, GROISMAN EA (2000) Nature **405** : 299-304.

[40] HANSSON K, SKÖLD O, SUNDSTRÖM L (1997) *Molec. Microbiol.* **5** : 1941-1959 ;
GRAVEL A, MESSIER N, ROY PH (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 5437-5442.

[41] NUNES-DÜBY SE, KWON HJ, TIRUMALAI RS, ELLENBERGER T, LANDY A (1998) *Nucleic Acids Res.* **26** : 391-406.

[42] GRINDLEY NDF (1997) *Curr. Biology* **7** *:* R608-R612.

[43] ROWE-MAGNUS DA & MAZEL D (1999) *Curr. Opininion Microbiol.* **2** : 483-488.

[44] FRANCIA MV & GARCIA LOBO JM (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 894-898.

[45] BISSONETTE L & ROY PH (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 1248-1257.

[46] BISSONETTE L, CHAMPETIER S, BUISSON J-P, ROY PH (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 4493-4502.

[47] COLWELL RR (1996) *Science* **274** : 2025-2031.

[48] HEIDELBERG JF et coll. (32 auteurs au total) (2000) *Nature* **406** : 477-486.

[49] BARKER A, CLARK CA, MANNING PA (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 5450-5458.

[50] ROSE-MAGNUS DA, GUEROUT A-M, MAZEL D (1999) *Res. Microbiol.* **150** : 641-651.

[51] LEVESQUE C, BRASSARD S, LAPOINTE J, ROY PH (1994) *Gene* **142** : 48-9-54 ;
MAZEL D, DYCHINCO B, WEBB VA, DAVIES J (1998) *Science* **280** : 605-608.

[52] HACKER J, BLUM-OEHLER G, MÜHLDORFER I, TSCHÄPE H (1997) *Molec. Microbiol.* **23** : 1089-1097.

[53] KARAOLIS DKR, JOHNSON JA, BAILEY CC, BOEDEKER EC, KAPER JB, REEVES PR (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95** : 3134-3139.

[54] ROWE-MAGNUS DA, GUEROUT A-M, PLONCARD P, DYCHINCO B, DVIES J, MAZEL D (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98** : 652-657.

[55] DANESE PN, PRATT LA, DOVE SL, KOLTER R (2000) *Mol. Microbiol.* **37** : 424-432.

[56] OLSÉN A, JOHNSSON A, NORMARK S (1989) *Nature* **338** : 652-655.

[57] POWER K & MARSHALL KC (1988) Biofouling **1** : 163-174 ;
MARSHALL KC (1992) *ASM News* **58** : 202-207.

[58] VIDAL O, LONGIN R, PRIGENT-COMBARET C, DOREL C, HOOREMEN M & LEJEUNE P (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 2442-2449.

[59] EBERL S (1999) *Syst. Appl. Microbiol.* **22** : 493-506 ;
MANEFIELD M, DE NYS R, KUMAR N, READ R, GIVSKOV M, STEINBERG P & KJELLEBERG S (1999) *Microbiology* **145** (pt2) : 283-291.

[60] PRIGENT-COMBARET C& LEJEUNE P (1999) *Methods Enzymol.* **310** : 56-79.

[61] SURETTE MG, MILLER MB, BASSLER BL (1999) **96** : 1639-1644.

[62] STEWART PS & COSTERTON JW (2001) *Lancet* **358** : 135-138.

[63] COCHRAN WL, MCFETERS GA, STEWART PS (2000) *J. Appl. Microbiol.* **88** : 22-30.

[64] GHIGO J-M (2001) *Nature* **412** : 442-445.

[65] MILLER MB & BASSLER BL (2001) *Annu. Rev. Microbiol.* **55** : 165-199.

[66] LIN JW, CHAO YF, WENG SF (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246** : 446-452.

[67] STEVENS AM, DOLAN KM, GREENBERG EP (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 12619-12623.

[68] KUO A, CALLAHAN SM, DUNLAP PV (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 971-976.

[69] FREEMAN JA & BASSLER BL (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 899-906 ;
BASSLER BL (1999) *Curr. Opin. Microbiol.* **2** : 582-587.

[70] CHEN X, SCHAUDER S, POTIER N, VAN DORSSELAER A,PELCZER I, BASSLER BL, HUGHSON FM (2002) *Nature* **415** : 545-549.

[71] MILLER MB & BASSLER BL (2001) *Annu. Rev. Microbiol.* **55** : 165-199.

[72] CALLAHAN SM & DUNLAP PV (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 2811-2822.

[73] SOLOMON JM, LAZAZZEA BA, Grossman AD (1996) *Genes Dev.* **9** : 547-558.

[74] SHAPIRO JA (1987) *J. Bacteriol.* 197 : 142-156 ; *Shapiro JA* (1995) *J. Bacteriol.* **17** : 597-607.

[75] RAUPRICH O, MATSUSHITA M, WEIJER K, SIEGERT F, ESIPOV S & SHAPIRA JA (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 6525-6538 ;
MATSUYAMA T, TGAGI Y, NAGAGAWA Y, ITOH H, WAKITA J & MATSUSHITA M (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 385-393.

[76] BEN-JACOB E, SCHOCHET O, TENEBAUM A, COHEN I, CZIRÓK A & VICSEK T (1994) *Nature* **368** : 46-48.

[77] SHAPIRO JA (1998) *Annu. Rev. Microbiol.* **52** : 81-104.

CHAPITRE 3
OXYDATIONS MINÉRALES

Le méthane, l'ammoniac, le monoxyde de carbone, l'hydrogène sulfuré, le fer, le cyanure sont autant de substrats très simples dont l'oxydation par l'oxygène de l'air fournit aux organismes spécialisés toute l'énergie nécessaire à leur développement. Ce chapitre passe en revue les principales oxydations de ce type. Les germes responsables sont des chimio-lithotrophes, parfois des autotrophes qui utilisent le gaz carbonique comme seule source de carbone. Tous ces germes acceptent un mode de vie spartiate, mais ce sont des maillons essentiels dans le cycle des éléments de la biosphère. Ils contribuent dans une large mesure au nettoyage de l'environnement en limitant l'accumulation de produits indésirables. L'élimination des déchets de l'activité humaine a souvent besoin de leur intervention.

3 – Oxydations minérales

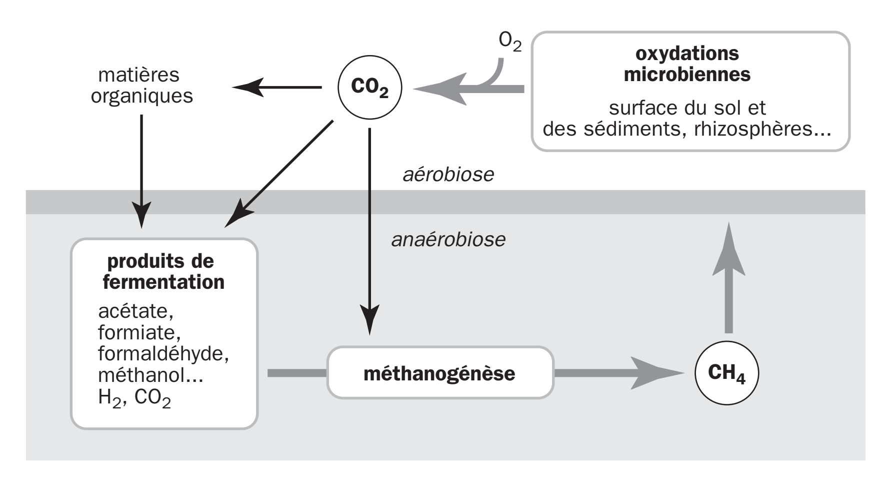
Le méthane, l'ammoniac, l'hydrogène sulfuré, le fer, le cyanure sont autant de substrats très simples dont l'oxydation fournit aux organismes spécialisés toute l'énergie nécessaire à leur développement. Ces germes sont des chimio-lithotrophes. Il n'est pas rare de trouver parmi eux des autotrophes qui utilisent le gaz carbonique comme seule source de carbone. Tous ces germes acceptent donc un mode de vie spartiate, mais ce sont des maillons essentiels dans le cycle des éléments de la biosphère. Ils contribuent dans une large mesure au nettoyage de l'environnement en limitant l'accumulation de produits indésirables, et beaucoup de biodégradations se font avec leur aide...

3.1 - Un cycle naturel du méthane

Le méthane est somme toute le plus simple des composés carbonés, un gaz discret et omniprésent dans la biosphère. Dans l'atmosphère terrestre primitive qui a vu apparaître les premières formes vivantes, le méthane pourrait avoir aidé la genèse de molécules organiques plus compliquées, alors que les conditions étaient très réductrices. On a supposé que les émissions volcaniques les plus anciennes contenaient des formes plus réduites (H_2, NH_3, CH_4, H_2S) que les exhalations modernes : CO_2, H_2O, N_2, SO_2, traces de H_2 et CO. Le méthane a été identifié dans l'atmosphère de Titan **[1]**. Les expériences de Schlessinger et Miller **[2]** ont signalé son importance possible pour les premières ébauches de la vie en démontrant une synthèse d'acides aminés et d'autres composés biologiques par décharges électriques dans différents mélanges de méthane, d'hydrogène, de monoxyde de carbone et de CO_2. Ce sujet a été discuté, il a quelques années, par Kasting **[3]**. L'influence du méthane contemporain sur l'environnement se fait sentir au moins à deux niveaux. Le premier correspond à l'effet de serre. Le second est l'utilisation du méthane comme source énergétique par des micro-organismes aérobies. La source du méthane est en grande partie biologique, partout où l'oxygène fait strictement défaut, dans le sol, les sédiments et le fond des océans. Les activités humaines viennent en renfort parce que le méthane est produit dans les cultures (rizières), par l'extension de l'élevage ou par l'épandage des déchets. La production de méthane liée aux activités humaines serait de 330 à 400 millions de tonnes par an. L'examen des gaz emprisonnés dans les glaces polaires indique que le méthane atmosphérique a plus que doublé depuis le début de l'ère industrielle. La

teneur actuelle du méthane atteint 1,8 ppmv après avoir augmenté de 1% par an depuis trente ans **[4]**.

La contribution du méthane atmosphérique à l'absorption de l'énergie solaire et à l'effet de serre n'est pas négligeable. La concentration moyenne en CO_2 est passée de 315 à 358 ppmv entre 1800 et 1995, elle est maintenant proche de 370, soit 50% d'augmentation liée en grande partie à la combustion des hydrocarbures fossiles. Malgré sa teneur bien plus faible, le méthane absorbe 24 fois plus d'énergie à masse égale et son influence grimpe à près de 12% de l'effet total [1]. On estime d'autre part que d'énormes réserves de méthane sont à l'état immobilisé par association avec l'eau sous forme d'*hydrate de méthane**. Les sédiments océaniques profonds en contiendraient de grandes quantités constituant un réservoir potentiel de gaz.



Alternance méthane / dioxyde de carbone

Le deuxième niveau d'influence du méthane sur l'environnement tient à son oxydation par des micro-organismes qui s'en servent comme source d'énergie. L'apport de méthane dans la biosphère est double. Une partie est d'origine tellurique (méthane géologique) et provient des grandes profondeurs de l'écorce. Le reste résulte de l'activité des bactéries **méthanogènes** par réduction du gaz carbonique et de différents produits de fermentation. Inversement le méthane est oxydé à l'air par les **méthanotrophes**. Leur action est doublée par la destruction photochimique qui intervient dans la basse atmosphère par réaction du méthane sur les radicaux hydroxyle ($OH^\bullet$), et on estime que cette voie d'élimination du méthane atmosphérique est prédominante. La réaction produit du monoxyde de carbone, de l'ozone et de l'eau. La durée moyenne de séjour d'une molécule de méthane dans la troposphère n'est pas connue avec certitude. Elle serait d'une dizaine d'années. Du méthane atmosphérique est réabsorbé par le sol et les eaux.

1 - *Les différentes contributions des gaz à effet de serre autres que la vapeur d'eau sont en gros 57% pour le gaz carbonique, 6% pour les oxydes nitreux. Le reste (25%) est dû aux chlorofluorocarbones et autres composés d'origine industrielle.*

La destruction du méthane revient surtout à des micro-organismes. Il y a donc un cycle biologique du méthane qui contribue au brassage du carbone dans la nature au même titre que les autres échanges gazeux de la photosynthèse, des fermentations et des oxydations de matières organiques.

Le taux de méthane dans la biosphère résulte de l'équilibre dynamique où s'affrontent la vitesse de sa formation et son taux d'utilisation. Nous savons que la synthèse biologique du méthane est la propriété exclusive de micro-organismes strictement anaérobies qui sont tous des **archaebactéries**. Ces organismes tirent leur énergie de la synthèse du méthane qui se fait par réduction du gaz carbonique, ou encore par décomposition de l'acide acétique et d'autres composés organiques. Les bactéries utilisatrices du méthane sont aérobies et récupèrent l'énergie de son oxydation. Elles se trouvent à la surface du sol, dans les eaux et aussi autour des racines des plantes au niveau de la rhizosphère. Une certaine aérobiose y est maintenue parce que les racines émettent de l'oxygène que les micro-organismes récupèrent pour leurs oxydations. Cet oxygène est absolument indispensable aux champignons. Ainsi des racines ou des rhizomes baignant dans des sédiments ou des vases anoxiques peuvent néanmoins maintenir à leur surface un micro-environnement suffisamment oxygéné pour autoriser la croissance des champignons et autres espèces aérobies. La végétation flottante des rivières et des étangs n'est pas en reste. On a constaté une oxydation significative du méthane au niveau des jacinthes d'eau (*Eichornia crassipes*) et des lentilles d'eau (*Lemna minor*). Il y a donc d'un côté les méthanogènes et de l'autre les méthanotrophes, deux populations qui ne s'interpénètrent pas. On peut remarquer que le cycle du méthane avec son va-et-vient du carbone entre CO_2 et CH_4 est une affaire exclusive de procaryotes. Un des objectifs de ce chapitre est l'oxydation du méthane. Il nous fera découvrir une voie assimilatrice originale du carbone et signalera en même temps son intérêt dans la biodégradation de composés naturels ou artificiels.

3.2 - LE MÉTHANE, SOURCE DE CARBONE ET D'ÉNERGIE

Le méthane n'est pas seulement un très bon carburant pour usages domestiques, c'est aussi une excellente source d'énergie pour des bactéries qui s'en nourrissent et en tirent tout le carbone pour leurs synthèses. Un petit miracle parce qu'il est très stable et chimiquement peu réactif, inerte pour la plupart des êtres vivants, sauf pour les **méthanotrophes**, qui sont des procaryotes et quelques levures spécialisées renfermant une méthane mono-oxygénase. Les bactéries sont les acteurs majoritaires de l'oxydation du méthane. Des micro-organismes marins détectés depuis peu présentent cependant une situation particulière **[5]**. Le méthane est consommé par une association anaérobie entre deux partenaires au sein de sédiments où l'oxygène diatomique n'intervient pas. Des bactéries sont capables de catalyser la réaction $CH_4 + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$, qui est l'inverse de la méthanogénèse. Leurs associées sont des sulfato-réducteurs, qui consomment rapidement l'hydrogène formé en réduisant le sulfate jusqu'au niveau sulfure. Cette

association de deux organismes résulte d'une *syntrophie**. En somme le recyclage du méthane dans la nature fait appel aux deux réactions globales :

$$CH_4 + 2\,O_2 \longrightarrow CO_2 + 2\,H_2O \qquad \text{(aérobie)} \quad (1)$$

$$CH_4 + SO_4^{2-} \longrightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O \qquad \text{(association anaérobie)} \quad (2)$$

Le premier mécanisme est celui qui nous intéresse ici. Le second est un événement complètement distinct sur lequel nous reviendrons en examinant les sulfato-réducteurs.

Les méthanotrophes se caractérisent donc par leur pouvoir de se développer sur méthane comme seule source de carbone et d'énergie. Le principe de base est très simple. Quatre oxydations successives convertissent le méthane en CO_2. La première engendre du méthanol. Tous les méthanotrophes sont donc en même temps des méthylotrophes potentiels, mais la plupart des espèces ont absolument besoin de méthane pour se développer. Elles sont alors des méthanotrophes obligés **[6]**. Inversement les méthylotrophes sensu stricto n'utilisent pas le méthane, car ils manquent de l'enzyme essentielle qui est la méthane mono-oxygénase, mais peuvent se développer sur le méthanol et d'autres substrats.

Le méthane est un substrat énergétique. Les quatre oxydations successives qui conduisent au gaz carbonique mettent en jeu chacune deux électrons. Le méthane sert aussi de source de carbone sans laquelle aucune croissance ne serait possible. En principe plusieurs solutions sont offertes. La première est une réduction assimilatrice du gaz carbonique par un cycle de type CALVIN-BENSON, comme le font les plantes. Les autres procèdent de l'incorporation dans les molécules organiques d'un stade d'oxydation intermédiaire du méthane. La nature a accordé sa préférence au **formaldéhyde**, qui est assimilé selon une biochimie particulière. La réaction **1** du schéma correspond à une mono-oxygénation consommatrice de pouvoir réducteur, qui produit du méthanol plus facile à métaboliser, tandis que les réactions suivantes sont génératrices d'énergie.

$$CH_4 + O_2 + NADH + H^+ \longrightarrow CH_3OH + H_2O + NAD^+ \qquad (3)$$

oxydations énergétiques

CH_4 —**1**→ CH_3OH —**2**→ $H_2C{=}O$ —**3**→ $HCOO^-$ —**4**→ CO_2

assimilation du carbone au niveau formaldéhyde

Le méthane est source de carbone et d'énergie

Les bactéries tirent l'essentiel de leur énergie par les oxydations **2**, **3** et **4**. Les électrons sont canalisés par une chaîne respiratoire complexe construite chez diverses espèces par une batterie de cytochromes c qui renferment invariablement plusieurs hèmes. Cette particularité se retrouve dans les bactéries qui l'oxydent l'ammoniac. Plusieurs cytochromes c "multi-hèmes" existent chez *Methylococcus*

capsulatus. L'un d'eux possède une haute masse moléculaire pas moins de 16 hèmes de type C [7] ! Cette complexité permettrait une adaptation perfectionnée à des conditions variées ainsi qu'à l'usage d'une gamme étendue de substrats.

La **méthane mono-oxygénase** catalyse la réaction **1**. L'enzyme utilise l'oxygène moléculaire et une source d'électrons qui peut être NADH. Elle existe sous deux formes, membranaire et soluble. L'enzyme liée à la membrane existe chez toutes les espèces et reçoit les électrons de la chaîne respiratoire, tandis que la forme soluble les récupère sur NADH et n'existe que chez certaines espèces. Cette dernière est cependant la plus facile à purifier, et par conséquent la mieux connue après cristallisation et analyse structurale très détaillée. Son site actif contient du fer. L'oxygénase membranaire fonctionne aussi avec du cuivre. Elle n'apparaît d'habitude que lorsque le milieu contient une quantité suffisante de cuivre à l'état de Cu(I) ou de Cu(II). Certains auteurs ont proposé que le métal était présent dans le site actif sous forme d'un noyau regroupant trois ions cuivre [8]. Il est à peu près prouvé que le cuivre est indispensable à la stabilité de l'enzyme. Son intervention directe dans la catalyse est moins évidente. ZAHN et DISPIRITO [9] ont montré que l'oxygénase contenait aussi du fer. Sur la foi de résultats obtenus par RPE, ces auteurs avancent l'idée selon laquelle le cuivre serait surtout un élément stabilisateur, le site catalytique pouvant contenir un centre bi-métallique mixte du type fer-cuivre comme celui qui existe dans la cytochrome c oxydase. La question reste donc ouverte.

Le facteur le plus performant dans les biodégradations liées à l'oxydation du méthane est la **mono-oxygénase soluble** (ou méthane hydroxylase). Sa biosynthèse ne s'observe que dans les conditions où il y a peu de cuivre, soit au-dessous de 1 μmol . mg^{-1} de biomasse. Elle résulte à l'évidence d'une évolution complètement indépendante de la précédente. Il n'est plus question ici de la participation du cuivre, mais de celle du fer. Pourquoi cette enzyme est-elle extraordinaire ? Grâce à son manque de spécificité, elle peut transformer par l'oxygène de l'air bien d'autres substrats que le seul méthane. L'éventail de ses compétences est encore plus large que celui de l'enzyme membranaire. D'où son utilité dans l'environnement. Non seulement l'enzyme aide à boucler le cycle du méthane, empêchant celui-ci de s'accumuler dans l'atmosphère, mais est très peu regardante sur son substrat à oxyder. On lui connaît largement plus de cent substrats possibles où se rencontrent des hydrocarbures saturés ou non, et divers dérivés halogénés dont le trichloroéthylène. L'attaque de celui-ci est l'un des meilleurs fleurons de la mono-oxygénase soluble, qui est à cet égard au moins mille fois plus réactive que la mono-oxygénase membranaire. Parmi les composés dégradés figurent des polluants divers répandus par l'industrie, et l'on réalise immédiatement tout l'intérêt de ce système.

La méthane mono-oxygénase soluble de *Methylococcus capsulatus* est un complexe de masse moléculaire élevée (225 kDa) comportant trois parties : une hydroxylase ou protéine A, une protéine dite de couplage B et une réductase flavinique C contenant du FAD et un centre fer-soufre de type [2Fe-2S]. La présence de ce centre fer-soufre unique met la puce à l'oreille. Elle montre que les électrons sont canalisés un par un vers l'hydroxylase après avoir été prélevés par paires sur le

donneur initial qui est NADH ou NADPH, puis transmis par la flavine. Cette disposition est assez caractéristique de nombreux systèmes du type réductase/oxygénase. L'hydroxylase a le rôle essentiel, car elle contient les sites fixant le substrat et l'oxygène. Son fer est non héminique, ce qui la distingue d'autres mono-oxygénases que nous observerons par la suite. Les électrons transmis par la réductase en provenance du NAD(P)H vont réduire l'atome d'oxygène qui se retrouvera dans la molécule d'eau. La protéine B aurait une fonction régulatrice. Sa présence accélère énormément le cycle catalytique et oriente son fonctionnement vers la mono-oxygénation au détriment d'une action comme oxydase **[10].** On a l'impression que la protéine B déforme l'hydroxylase et modifie ses performances. Cette idée n'a pas encore reçu d'explication claire, mais tout suggère que la présence de B n'est pas neutre, et qu'elle intervient d'une façon ou d'une autre dans la catalyse.

La structure détaillée de la protéine A (l'hydroxylase) est connue **[11]**. Elle est constituée de deux parties symétriques de formule quaternaire totale $(\alpha\beta\gamma)_2$. L'association des deux protomères $\alpha\beta\gamma$ se fait surtout par les chaînes β, et ménage une profonde crevasse centrale vers laquelle sont tournés les deux sites actifs. Le fer est représenté au niveau de chaque sous-unité α sous forme de deux ions Fe(III) reliés par un pont hydroxo. Le noyau formé par les deux ions métalliques placés à environ 3,1 Å l'un de l'autre et reliés par un atome d'oxygène constitue un pôle réactif exceptionnel permettant l'activation d'O_2, l'anion étant soit du carbonate soit de l'acétate.

Les deux ions Fe ont chacun 6 coordinences avec des donneurs représentés par Glu, Asp, His ou des molécules d'eau. Il y a toujours sur chaque métal une liaison qui est déplaçable par le substrat ou par un atome d'oxygène appartenant à O_2.

Le noyau bi-métallique

Les deux ions du fer sont liés par un hydroxyle. Le noyau bi-métallique du dessin a été caractérisé en spectroscopie optique, RPE ou MÖSSBAUER. Il est très similaire à celui que nous retrouverons dans une série d'enzymes : dioxygénases du benzène et du naphtalène, mono-oxygénases du toluène et du phénol, toluène 2- et 4-mono-oxygénases et phénol hydroxylase. Toutes ces protéines sont apparentées par leur séquence renfermant deux motifs consensus (D ou E)-$x_{28\text{-}37}$DExRH qui correspondent chacun aux liens avec un ion fer. Ce type de structure n'est pas rare. D'autres protéines ont un centre bi-métallique du même type, notamment l'hémérythrine et la ribonucléotide réductase.

Le fer a pour fonction d'activer l'oxygène diatomique de façon à lui permettre de se scinder. L'un des atomes est injecté dans le substrat. L'autre atome est emporté par une molécule d'eau dans le cas d'une mono-oxygénase, ou est placé à une autre position du substrat si l'enzyme est une dioxygénase comme celle du benzène. Le mécanisme précis est incomplètement élucidé. L'oxydation d'une position carbonée saturée dans un hydrocarbure implique normalement le passage

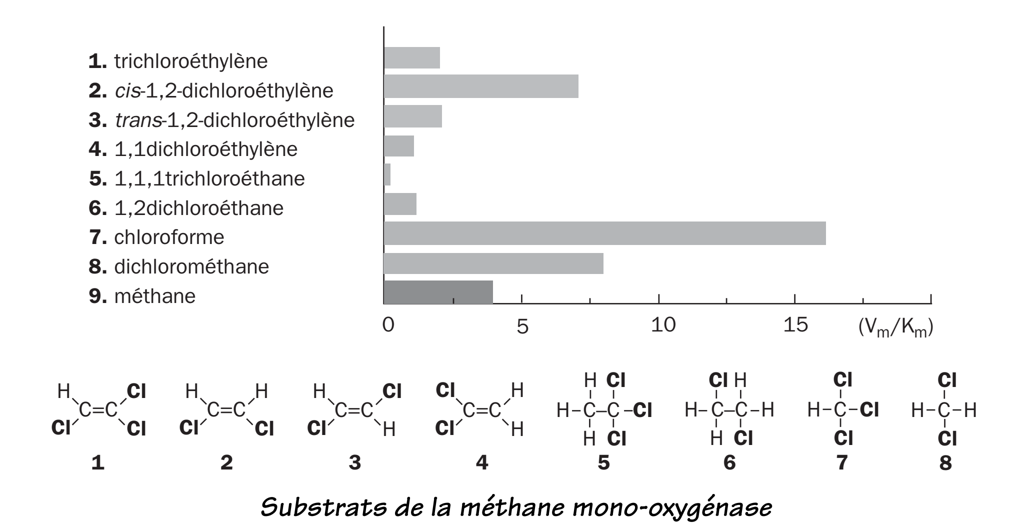
par un radical intermédiaire. La formation transitoire d'un tel radical est facilitée dans une chaîne carbonée au niveau d'une ramification. Le méthane représente un cas extrême, puisqu'il y a 4 atomes d'hydrogène autour du carbone sans aucune substitution. Le méthane est donc une molécule stable, peu réactive, relativement très solide. Son attaque exige les grands moyens, et c'est pourquoi l'enzyme a donc une double fonction, qui consiste à exacerber la réactivité d'O_2 et à forcer l'apparition du radical $^{\bullet}CH_3$ à partir du méthane. Cet aspect chimique particulier explique peut-être pourquoi il a été sélectionné dans la nature un catalyseur doté d'un pôle réactif bi-métallique où les deux ions Fe(II) ou Fe(III) sont réunis par un pont comportant un hydroxyle. Cette question appelle une petite digression. Un site bi-métallique du même genre existe dans la *ribonucléotide réductase** de la majorité des organismes aérobies. Cette enzyme crée le désoxyribose à partir du ribose. Le remplacement d'un hydroxyle à la position 2' du ribose par un atome d'hydrogène demande un mécanisme réactionnel particulier où la formation intermédiaire d'un radical carboné est absolument requise. L'enzyme comporte deux parties désignées par **R1** et **R2**. Le site catalytique est sur R1. Un noyau ferrique double comparable à celui de la méthane mono-oxygénase est sur la partie R2. Celle-ci se contente de stabiliser un radical placé sur une chaîne latérale de tyrosine. Le radical est transmis à distance à la partie R1 qui l'utilise dans son site catalytique pour modifier le substrat. Le centre bi-métallique de la ribonucléotide réductase est donc un dispositif chargé de maintenir en place le radical nécessaire au cycle catalytique sur R1. On peut penser qu'un dispositif de même nature a été appelé au cours de l'évolution pour l'oxydation du méthane, en vue de faciliter l'apparition d'un radical au cours de l'oxydation du substrat. À l'évidence l'apport du double noyau ferrique n'a été qu'une solution parmi d'autres, puisque la seconde oxygénase du méthane, localisée dans la membrane, a un pôle différent contenant du cuivre.

La méthane oxygénase soluble a des propriétés extraordinaires. Son site catalytique n'est qu'une surface d'adhésion non sélective, capable de fixer un peu n'importe quoi si des interactions hydrophobes sont possibles. Des molécules hydrocarbonées dont la plus simple est évidemment CH_4, sont susceptibles de venir "scotcher" temporairement la plage hydrophobe de chaque protomère autour du centre bi-métallique et au contact direct de l'oxygène activé. D'autres exemples sont les peroxydases et diverses protéases. Dans la majeure partie des cas, la reconnaissance d'un substrat par une protéine se fait sur des critères plus précis où la taille et l'orientation de la molécule partenaire dans le site sont cruciales. Le facteur essentiel reste ici la possibilité pour la molécule étrangère de venir adhérer au voisinage du fer, là où se forme un pôle réactif constitué par l'oxygène activé. La méthane oxygénase soluble effectue une transformation efficace du méthane (K_m = 3 µM, V_m = 56 nmol . mg de protéine^{-1} . min^{-1}) **[12]**. Chose curieuse, ce n'est pas le meilleur substrat possible. L'enzyme est même bien plus active sur le chloroforme ou le dichloro-méthane **[13]**. Le naphtalène est transformé en naphtols, dont la présence est facilement mesurable par diazotation en composés de couleur violette par l'*ortho*-dianisidine. Cette propriété tombe à pic pour détecter les mono-oxygénases solubles dans les méthanotrophes en culture ou sur boîte avec un taux minimal de cuivre. L'enzyme membranaire ne fait pas de naphtols et ne donne pas cette coloration.

L'attaque des composés halogénés est particulièrement intéressante, puisqu'il s'agit souvent de produits nuisibles pour l'environnement. Le chloroforme et le dichloro-méthane sont dégradés complètement par les bactéries en CO_2 et H_2O, l'halogène étant éliminé sous forme de chlorure. Cette minéralisation par les méthanotrophes survient par cométabolisme sous l'effet initial de la mono-oxygénase soluble. Il y a généralement corrélation entre le taux d'attaque de différents composés halogénés et le taux de mono-oxygénase soluble dans les bactéries. Une augmentation du cuivre ambiant nuit à cette propriété, car l'oxygénase soluble est réprimée et l'enzyme membranaire qui tend à la remplacer ne peut pas prendre aussi bien le relais de ces biodégradations. Le TCE est reconnu et traité efficacement, avec un K_m très bas (0,35 µM) et un taux de conversion presque aussi élevé que celui du méthane. Or le TCE est particulièrement redoutable, car il peut engendrer des produits toxiques et cancérigènes. En outre c'est un rejet industriel fréquent dont le grand défaut est d'être rémanent. Le TCE et le tétrachloroéthylène ont été dénoncés comme des contaminants majeurs dans les eaux de certains pays, notamment aux États-Unis, et sa durée de vie moyenne dans les aquifères atteindrait 300 jours !

L'attaque du TCE par la méthane mono-oxygénase soluble de *Methylosinus trichosporium* conduit à la formation d'un époxyde. Elle est relativement rapide, à raison de 680 nmol . mg de protéine^{-1} . min^{-1}, avec un K_m égal à 35 µM. L'époxyde est transformé en chloral, acide glyoxylique et chlorure, puis en CO_2 et H_2O. Le nettoyage du TCE par la mono-oxygénase soluble a ses revers. Celle-ci n'est pleinement exprimée dans un biotope contaminé qu'en fonction du développement des méthanotrophes, qui est soumis à la présence d'autres substrats (cométabolisme), aux effets toxiques du TCE à faible dose et à la compétition entre espèces dans les sols. Par exemple la présence d'ammoniac a un effet contraire. En outre le trichloroéthylène n'est pas un substrat de tout repos pour la mono-oxygénase, car son oxydation crée des liaisons covalentes avec les sous-unités de l'enzyme, dont l'inactivation devient irréversible. On admet que chaque molécule de protéine est inactivée après avoir oxydé de l'ordre de 200 molécules de TCE. Aussi doit-on s'attendre à ce que la disparition du TCE dans l'environnement soit assez lente. Sa vie moyenne dans les nappes phréatiques est alors assez longue pour exercer des effets néfastes sur la faune et la flore. Un tableau permet de comparer l'activité de l'enzyme sur le méthane et sur plusieurs substrats chlorés dont le TCE et le chloroforme. La mono-oxygénase est d'autant plus efficace que V_m et $1/K_m$ sont plus grands. La faiblesse de l'attaque sur le trichloroéthane s'explique probablement par l'encombrement stérique local dû à l'entassement des atomes de chlore. Même explication pour le tétrachloroéthylène, qui ne figure pas dans le tableau. Ce dérivé totalement halogéné résiste à l'action de l'enzyme et se comporte comme un inhibiteur compétitif.

La variété des substrats traités par la méthane mono-oxygénase soluble a de quoi séduire. L'enzyme oxyde aussi en alcool benzylique le toluène, qui n'est jamais qu'un dérivé phénylé du méthane. C'est donc bien le groupe méthyle qui est oxygéné. Dans le cas du styrène (vinylbenzène), la double liaison du groupe vinyle est sujette à époxydation. Le noyau benzénique lui-même peut être attaqué, comme dans le cas du nitrobenzène.

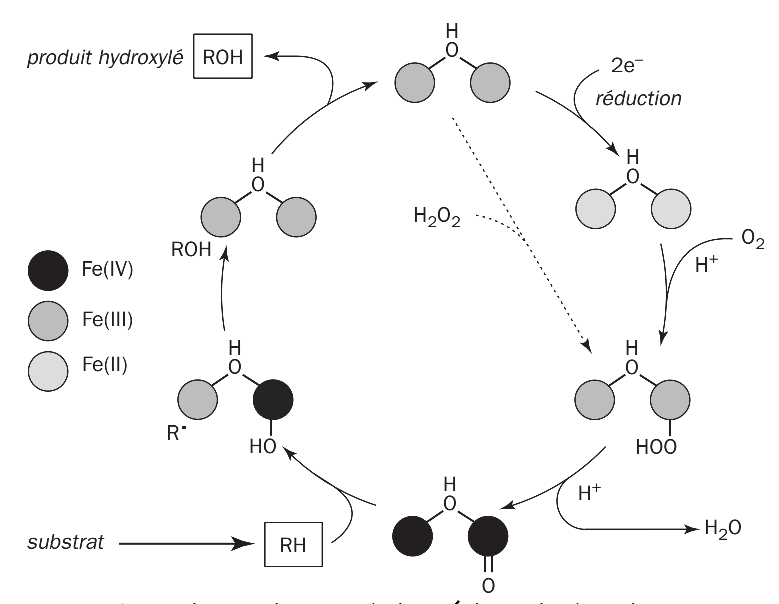


Substrats de la méthane mono-oxygénase

Ce substrat est hydroxylé en un mélange de 3- et 4-nitrophénols. Le tableau révèle la remarquable efficacité de l'enzyme sur le chloroforme, une propriété assez caractéristique de l'enzyme soluble par rapport à la mono-oxygénase membranaire qui n'attaque le chloroforme que faiblement. L'oxygénase soluble n'est cependant pas une panacée utilisable à l'élimination de n'importe quel substrat chloré. On le voit bien par la faiblesse de son action sur le méthylchloroforme (1,1,1-trichloro-éthane). Ce solvant largement utilisé pour le dégraissage et le nettoyage à sec a été mis à l'index par le protocole de Montréal (1987) par suite de sa rémanence dans la troposphère. Sa vie moyenne y est de plusieurs années. Il disparaît lentement par réaction sur les radicaux hydroxyle, mais gagne la stratosphère où il libère du chlore par photolyse. On le considère comme indirectement nocif pour la couche d'ozone.

Le cycle catalytique de la méthane mono-oxygénase commence par une réduction à deux électrons qui précède la venue du substrat dans la poche du site actif. Le noyau bi-métallique passe à l'état Fe(II). Fe(II) qui reçoit une molécule d'O_2. Il en résulte l'apparition d'une entité réactive de type oxène, à valence élevée : Fe(IV).Fe(IV) = O.

Le substrat intervient tardivement dans le cycle représenté page suivante. Sa transformation comporte l'ablation d'un atome d'hydrogène et l'apparition d'un radical. Le centre bi-métallique prend alors une valence mixte Fe(III).Fe(IV)–OH. Le retour à l'état initial se ferait par la réaction du radical avec l'oxygène du noyau bi-métallique. Ces différentes étapes ont été étudiées en détail par RPE et cinétique rapide dans le groupe de LIPSCOMB **[14]**, et le cycle indiqué est une interprétation des résultats du fonctionnement de l'hydroxylation par la protéine A. L'étape essentielle est donc la formation d'un radical responsable de l'attaque sur divers substrats. Dans le cas du noyau aromatique, l'oxygénation pourrait se faire directement par injection d'un atome d'oxygène sans formation d'un radical intermédiaire **[15]**.



Le cycle catalytique de la méthane hydroxylase

L'enzyme a le pouvoir d'agir de plusieurs façons. Elle peut court-circuiter l'étape de réduction de l'oxygène et du fer en oxydant le noyau bi-métallique directement par l'eau oxygénée. Cette propriété se retrouve dans les peroxydases et peut s'effectuer en absence d'oxygène diatomique. On voit que la méthane mono-oxygénase mérite bien le qualificatif d'"enzyme miracle".

L'emploi des souches formant une méthane oxygénase soluble n'est pas très facile. Son gène dans *Methylosinus trichosporium* est réprimé par des doses faibles d'ions Cu. En outre l'attaque du trichloroéthylène est fortement retardée par la présence du méthane, qui est nécessaire pour la croissance des germes. Pour y remédier, un fragment de séquence d'ADN d'une longueur de 5,5 kb contenant les gènes de la mono-oxygénase a été cloné dans un plasmide et exprimé chez plusieurs *Pseudomonas*. On a obtenu ainsi des souches à croissance relativement rapide, capables de dégrader le trichloroéthylène et le chloroforme, sans avoir les inconvénients présentés par la présence du cuivre et la compétition entre le substrat et le méthane **[16]**. En somme les méthanotrophes capables de produire la mono-oxygénase soluble offrent de grandes possibilités. La mono-oxygénase membranaire confère des propriétés comparables mais distinctes. Les cellules de la première catégorie peuvent se développer sur alcanes et alcènes à chaîne droite ou ramifiée comportant 4 à 8 atomes de carbone, ainsi que sur divers composés cycliques et aromatiques qui n'interviennent pas comme substrats de croissance. Les bactéries ne se développent que sur des hydrocarbures à chaîne courte. Certains substrats, comme les dérivés halogénés, sont traités par cométabolisme, mais leur transformation n'apporte aucune énergie à la cellule.

L'enzyme membranaire des méthanotrophes contient donc du cuivre. En présence des ions Cu, les cellules développent des empilements de membranes internes riches en méthane mono-oxygénase insoluble. Le développement de ces

membranes permet une augmentation de la surface où peut s'insérer l'enzyme essentielle. Cette propriété commune dans les méthanotrophes s'observe aussi chez les bactéries capables d'oxyder l'**ammoniac** et de participer à la nitrification des sols. Or l'enzyme membranaire des méthanotrophes a une certaine ressemblance avec la mono-oxygénase qui oxyde l'ammoniac chez des espèces comme *Nitrosomonas europeae*. L'ammoniac mono-oxygénase possède aussi du cuivre. Les deux systèmes présentent une nette homologie au niveau génétique et auraient une origine commune **[17]**. On manque de données structurales précises parce que ces protéines membranaires sont difficiles à purifier. Toutefois la mono-oxygénase de l'ammoniac a été obtenue sous forme homogène chez *N. europeae* et l'on connaît la séquence de ses gènes **[18]**. On suppose que les deux enzymes ont conservé le même modèle d'organisation moléculaire avant d'évoluer dans deux directions, d'une part vers l'oxydation de NH_3, d'autre part vers l'oxydation du CH_4. D'où la tentation d'extrapoler les propriétés de l'une de ces enzymes à l'autre. Cependant la physiologie de ces germes de part et d'autre n'est pas identique, et les niches écologiques qu'ils occupent ne se recouvrent que très partiellement. Évoquons les rapidement.

Nitrosomonas europeae fait partie des bactéries nitrifiantes et transforme l'ammoniac en hydroxylamine (NH_2OH), laquelle sera oxydée à son tour en nitrite par une déshydrogénase périplasmique. Le méthane est également oxydé à un taux plus faible. Ces oxydations sont productrices d'énergie et sont couplées avec milation de CO_2 par un cycle de CALVIN, car ces bactéries sont chimio-autotrophes et utilisent l'énergie des oxydations pour assimiler le gaz carbonique, contrairement aux plantes et autres organismes utilisateurs de lumière et désignés comme photo-autotrophes. Une section ultérieure plus détaillée (page 159) sera consacrée à l'oxydation de l'ammoniac.

Les méthanotrophes ont une physiologie très différente, mais oxydent un peu d'ammoniac parallèlement au méthane, et renferment d'ailleurs comme les bactéries nitrifiantes une oxydoréductase capable de transformer l'hydroxylamine en nitrite. Malgré la production de CO_2 à partir du méthane, beaucoup de méthanotrophes n'ont pas recours au cycle de CALVIN, mais assimilent une grande partie de leur carbone ou même sa totalité sous forme de formaldéhyde (HCHO). Les mono-oxygénases de ces deux séries de germes se ressemblent sur le plan fonctionnel. La source d'électrons directe n'est pas NADH. Ce rôle appartient à un **cytochrome** de type **b** ou **c**, ou encore à une quinone respiratoire réduite **[19]**. Les deux enzymes se ressemblent par une propriété intéressante. L'acétylène les inhibe en créant une liaison covalente avec l'un des polypeptides de la molécule. Cette réaction facilite le repérage de ces oxygénases, soit en utilisant de l'acétylène marqué au carbone-14, soit à l'aide d'un marqueur fluorescent contenant un groupe alkényle.

On sait que l'efficacité d'une enzyme dans les conditions optimales de son action dépend de deux paramètres : k_{cat} et K_m. Le premier exprime le nombre maximum de molécules de substrat que chaque molécule d'enzyme transforme par seconde. Le second est la concentration de substrat qui permet à l'enzyme de fonctionner à une vitesse moitié de la vitesse maximale théorique. La constante k_{cat} de la majorité

des enzymes est de plusieurs centaines, voire plusieurs milliers par seconde. Pour l'ammoniac mono-oxygénase, k_{cat} ne serait que de $20.s^{-1}$ sur NH_3, une valeur faible. Chose curieuse, l'enzyme a la potentialité d'oxyder le méthane pratiquement à la même vitesse. Il faudrait pour cela que le méthane atteigne un niveau très élevé qui n'est jamais atteint dans la pratique (la valeur du K_m de la protéine pour le méthane est bien plus grande que pour NH_3). L'ammoniac reste donc le substrat préféré de cette mono-oxygénase. La méthane mono-oxygénase présente une situation analogue, mais inversée. L'enzyme est également lente et oxyde aussi l'ammoniac, mais le méthane est cette fois le meilleur substrat.

Les oxygénases membranaires à Cu ont l'intérêt d'être peu spécifiques et de pouvoir transformer une foule de substrats organiques en même temps que leur substrat normal, ce qui leur confère une participation intéressante dans la défense de l'environnement. Il n'est pas rare dans la nature qu'une faible sélectivité des catalyseurs enzymatiques aille de pair avec une lenteur d'action (k_{cat} faible), mais cette relation n'a pas de caractère absolument général. Les deux mono-oxygénases citées ont la capacité de transformer divers substrats aliphatiques, notamment des composés halogénés du type chloroforme ou trichloroéthane **[20]**. Cette activité est néanmoins assez restreinte. La méthane mono-oxygénase membranaire des méthanotrophes n'est exprimée que si la teneur en cuivre atteint un taux suffisant, de l'ordre de 1 $\mu mole.mg^{-1}$ de biomasse. En outre l'oxydation du méthane est sensible à l'inhibition exercée par l'ammoniac engendré par la décomposition des matières organiques ou l'apport d'engrais. L'influence du cuivre complique les choses, parce que cet élément n'est généralement présent à l'état libre dans les sols qu'à très faible concentration. Il est volontiers adsorbé par l'humus, les argiles et les composés organiques. En somme les méthanotrophes et les bactéries nitrifiantes se partagent le marché des oxydations tous azimuts dans l'environnement. Ils oxydent à la fois le méthane, l'ammoniac et divers composés organiques selon des modalités diverses très sensibles aux conditions du milieu et difficiles à contrôler expérimentalement. On aura une meilleure idée de ces potentialités dans la section suivante. Il existe heureusement des moyens pour évaluer la part réelle revenant aux méthanotrophes. Par exemple l'oxydation du méthane dans les sols est inhibée par 0,5 mM d'acide picolinique (pyridine-2-carboxylique), alors que la transformation de NH_3 en nitrate résiste à des taux très supérieurs **[21]**. La présence des méthanotrophes dans les terrains est également révélée par amplification par PCR de l'ADN bactérien et l'identification de séquences génomiques relatives à des enzymes caractéristiques que nous rencontrerons plus loin. Quant aux propriétés des bactéries nitrifiantes, des données supplémentaires seront accessibles plus loin.

3.3 - CROISSANCE SUR MÉTHANE ET MÉTHANOL

On connaît actuellement plus d'une centaine d'espèces bactériennes capables de se développer sur méthane. Toutes ces bactéries ont en commun d'avoir une méthane mono-oxygénase transformant le méthane en méthanol, lequel est pris en

charge par une méthanol déshydrogénase spéciale, une quinoprotéine dont le cofacteur est le ***PQQ****. HANSON et d'autres auteurs ont également signalé l'existence de levures capables de se comporter facultativement comme des méthanotrophes **[22]**, mais cette observation n'a pas été confirmée. Par contre les levures méthylotrophes (se développant sur méthanol) ne sont pas rares. La plus étudiée est *Hansenula polymorpha*. Ces germes sont également capables d'utiliser des alcanes.

Les bactéries utilisatrices de méthane ne forment pas un groupe taxonomique homogène et ont évolué en lignées indépendantes. Elles se répartissent en deux grands groupes, I et II, qui se distinguent par des critères morphologiques et surtout par leur physiologie. Les premières, du **type I**, (*Methylococcus*, *Methylobacter*, *Methylomonas*) assimilent le carbone à partir du formaldéhyde, en utilisant un cycle métabolique spécial appelé cycle de l'**hexulose monophosphate** (XuMP). Les secondes, du **type II**, (*Methylosinus*, *Methylocystis*) assimilent le formaldéhyde par une voie complètement différente appelée **cycle de la sérine**. Ces deux modes seront expliqués plus loin. Sur la base de la comparaison des ARN 16S, le type I fait partie des *protéobactéries gamma**, et le type II aux alpha. On a reconnu depuis un **type X**, proche du type I, mais contenant la Rubisco du cycle de CALVIN et doté de caractères particuliers. Les méthanotrophes dans leur quasi-totalité ne peuvent se développer qu'en présence de méthane (méthanotrophes obligés [2]). Ils utilisent volontiers une foule de composés monocarbonés méthylés, sulfurés ou non (sulfure de méthyle, diméthylsulfure, choline, carbofuran…) Voici un tableau très simplifié pour montrer les différences entre les groupes I, X et II.

	Type I	*Type X*	*Type II*
Groupe de protéobactéries	Gamma	Gamma	Alpha
Cycle du XuMP	OUI	OUI	non
Cycle de la sérine	non	quelquefois	OUI
Fixation de N_2	non	OUI	OUI
Rubisco	non	OUI	non
Morphologie dominante	bâtonnets	*cocci*	bâtonnets
Vésicules membranaires internes	OUI	OUI	non
Membranes internes concentriques	non	non	OUI
Croissance à 45°C	non	OUI	non

Le diagnostic d'appartenance d'un isolat à ces différents groupes peut se faire par hybridation moléculaire avec des sondes nucléiques, détection d'enzymes caractéristiques du métabolisme ou composition en acides gras des phospholipides. Les méthanotrophes sont présents partout où il y a une source de méthane et d'oxygène. Les espèces dotées d'une nitrogénase réduisent N_2 lorsque le milieu est dépourvu d'azote ammoniacal ou organique, et ne peuvent le faire qu'en présence

2 - Il y a une incertitude sur ce sujet. Beaucoup de méthanotrophes peuvent oxyder une grande variété de composés organiques (d'où leur intérêt dans la dépollution), mais les transformations ont généralement lieu par cométabolisme, la source carbonée principale étant le méthane.

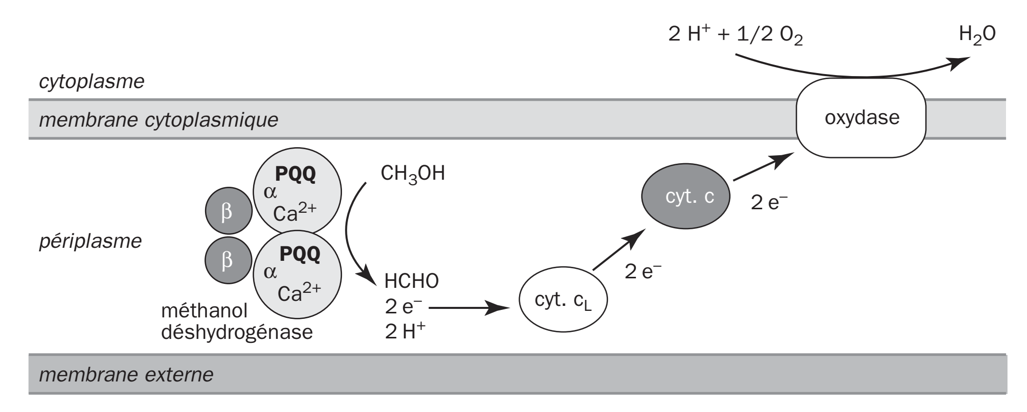
d'un taux faible d'oxygène dissous. Les données actuelles montrent que ces bactéries ont des potentialités extraordinairement variées, mais leur multiplication en culture pure est lente et rend plus difficile l'étude de leur physiologie. La réaction limitante de leur métabolisme est catalysée par les mono-oxygénases du méthane, mais leur coefficient K_m pour CH_4 est toujours inférieur à 10 µM traduisant une assez forte affinité pour le substrat.

Les méthanotrophes n'ont donc pas besoin de fortes concentrations de méthane pour se développer. Un grand nombre d'études ont tenté de mesurer le taux de méthane dans divers milieux et la vitesse de sa disparition. La situation à la surface du sol est très différente selon que le méthane disponible diffuse à partir les couches sous-jacentes où vivent les méthanogènes, ou si le gaz est dissous directement à partir de l'air ambiant. Dans le premier cas, la concentration en CH_4 peut être de l'ordre de 1 à 100 µM, des taux largement suffisants pour un bon développement des méthanotrophes. Dans le second cas, la teneur est beaucoup plus faible, de l'ordre de 2,5 nM seulement. On s'accorde à penser que les méthanotrophes ont malgré tout une activité non négligeable dans l'oxydation du méthane atmosphérique **[23]**. Les bactéries les mieux adaptées aux faibles taux de méthane appartiennent le plus souvent au type I. Quelques applications pratiques utilisent les méthanotrophes pour le traitement des sols, car un apport relativement restreint de gaz naturel suffit à favoriser le développement des méthanotrophes et leur emploi dans les décontaminations.

La plupart des méthanotrophes sont mésophiles et se développent à des températures inférieures à 40°C, avec un optimum vers 25°C. Cependant *Methylococcus capsulatus* peut se développer à près de 50°C. On a isolé dans les terres arctiques des souches qui croissent bien au-dessous de 15°C. L'optimum de pH est souvent situé du côté légèrement acide (6,0), mais l'oxydation du méthane peut continuer en milieu encore plus acide, notamment dans les tourbières (où le pH peut s'abaisser au-dessous de 4). Elle est partagée par des cellules de levure. La forte concentration en sel des marais salants et des lagunes côtières empêche pratiquement toute oxydation microbienne du méthane. La plupart des analyses de terrain montrent que les méthanotrophes ont généralement l'habitude de se développer en association avec d'autres germes qui leur apportent des facteurs de croissance et les aident à se débarrasser de produits secondaires issus des substrats autres que le méthane. Des espèces souvent associées aux méthanotrophes sont les *Hyphomicrobia* utilisatrices de méthanol, des bactéries à prosthèque comme les *Caulobacter*. Les *Hyphomicrobia* ont une très forte capacité à fixer les matières carbonées volatiles transportées par l'air et prédominent dans les milieux très pauvres. Ce sont des méthylotrophes facultatifs très spartiates pouvant se développer sur le formaldéhyde, l'éthanol et l'acide acétique. Leur développement se fait par un cycle de bourgeonnement particulier qui rappelle celui des *Caulobacter*. La convivialité naturelle des méthanotrophes et la variété de leurs associations expliquent pourquoi il est difficile d'extrapoler les résultats des cultures pures aux conditions réelles de l'environnement. Un problème classique, qui n'est d'ailleurs pas particulier aux méthanotrophes.

Comment le méthane et le méthanol sont-ils métabolisés ? Les germes qui partent du méthane sont les méthanotrophes et sont exclusivement des bactéries, tandis que ceux qui partent du méthanol, ou méthylotrophes, se recrutent à la fois chez les bactéries et les champignons, notamment les levures. Le stade clé est l'oxydation du méthanol en formaldéhyde par une *alcool déshydrogénase** ou ADH. Ces enzymes acceptent divers alcools. Le méthanol n'est substrat que pour certaines d'entre elles.

Contrairement aux levures qui utilisent une méthanol oxydase à FAD, les bactéries Gram-négatives ont une **méthanol déshydrogénase** (EC 1.1.99.8) qui a la particularité d'utiliser un cofacteur particulier appelé **PQQ**. Cette enzyme de formule $\alpha_2\beta_2$ est périplasmique et contient du calcium dont le rôle est structural. Elle transmet ses électrons à la cytochrome oxydase membranaire par l'intermédiaire de cytochromes c dont le premier terme (c_L) appartient à une catégorie spéciale. Un dessin représente la situation dans *Methylobacterium extorquens* et *Paracoccus denitrificans* **[24]**. La croissance de celui-ci sur méthanol se fait généralement en milieu aérobie, mais reste possible en absence de O_2 avec le nitrate comme accepteur.



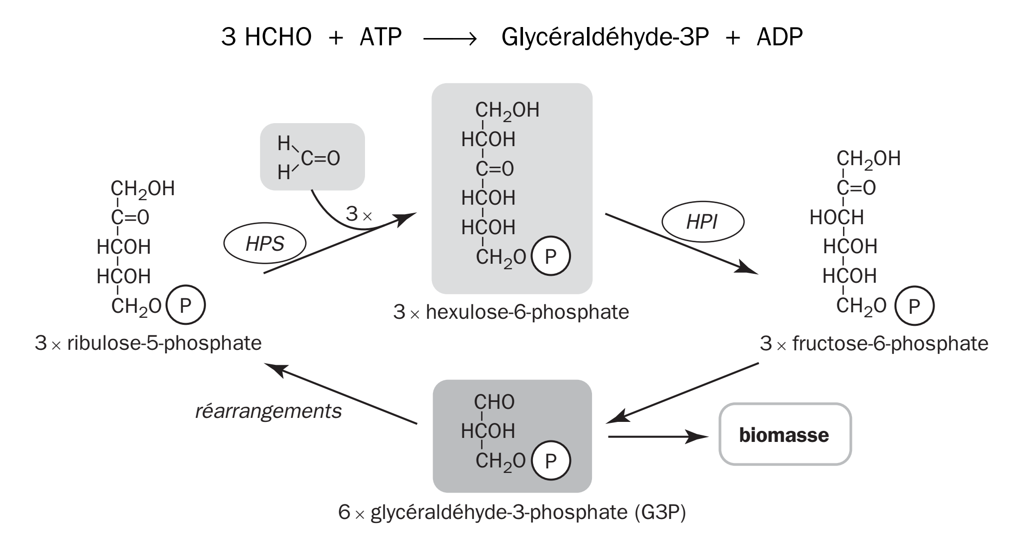
Oxydation du méthanol

Cette oxydation est moins bien connue chez les Gram-positives et offre des solutions variées avec la participation de PQQ et de NAD^+. *Bacillus methanolicus* est une espèce thermo-tolérante capable de se développer sur méthanol à plus de 50°C **[25]** et contient NAD^+ comme cofacteur fortement lié. Une autre espèce particulièrement étudiée est *Amycolaptopsis methanolica* **[26]**. Il convient de signaler que le méthanol ne provient pas uniquement de l'oxydation du méthane. Il est produit en abondance par la dégradation de composants naturels du règne végétal : esters et éthers méthyliques émanant des pectines et lignines. Cela explique pourquoi les méthylotrophes sont si nombreux et variés dans le sol. Le **formaldéhyde** occupe une position clé du métabolisme. Il existe deux grandes stratégies métaboliques pour l'assimiler chez les bactéries. Dans le cycle de l'hexulose-monophosphate, le formaldéhyde est soudé par aldolisation à un accepteur en C5. Le cycle de la sérine implique une double incorporation de formaldéhyde et de CO_2, le premier sur la glycine, le second par carboxylation du PEP.

Les levures méthylotrophes ont une stratégie distincte, mais utilisent un cycle similaire (xylulose-monophosphate).

Dans le cycle du **ribulose-monophosphate** des méthanotrophes de type I (*Methylosinus*, *Methylocystis*), l'accepteur de formaldéhyde est le ribulose-5-phosphate **[27]**. L'hexulose-6-phosphate synthase (**HPS**) et l'hexulose-phosphate isomérase (**HPI**) sont les enzymes caractéristiques. Le bilan global de l'entrée du formaldéhyde peut s'écrire :

$$3\ HCHO + ATP \longrightarrow \text{Glycéraldéhyde-3P} + ADP$$



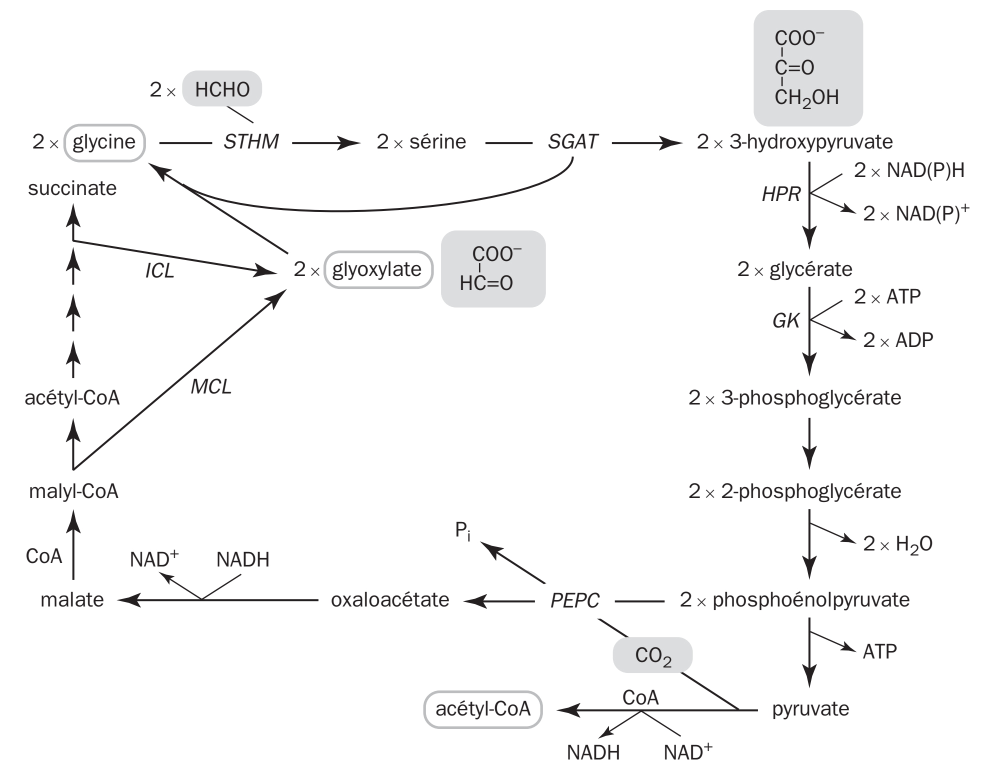
Le cycle du ribulose monophosphate

Le cycle n'a pas été représenté en entier pour ne garder que l'essentiel. Ce métabolisme assimilateur est considéré comme performant car il consomme peu d'énergie ATP. La succession des transformations du fructose-6-phosphate en ribulose-5-phosphate n'est pas détaillée. Elle met en jeu plusieurs étapes qu'on retrouve dans le cycle de CALVIN [3], mais avec une dépense d'énergie totale bien plus faible. C'est un point important. Divers méthylotrophes sont en même temps des autotrophes : ils utilisent le dioxyde de carbone formé à partir du formaldéhyde pour l'assimiler par le cycle de CALVIN et profitent justement des enzymes qui fonctionnent en même temps dans les deux voies.

Les méthanotrophes de ***type II*** (*Methylomonas*, *Methylobacter*) incorporent le formaldéhyde dans la **sérine** selon un principe qui n'a rien à voir avec le précédent. La réaction de départ est catalysée par la sérine-hydroxyméthyl transférase (STHM) utilisant la glycine et le formaldéhyde sous forme d'une combinaison avec le tétrahydrofolate*. Le schéma du cycle, assez compliqué, est celui qui reçoit le meilleur assentiment malgré diverses incertitudes **[28]**. L'ensemble de cette voie consiste à incorporer deux molécules de formaldéhyde sous forme d'acétyle (dans l'acétyl-CoA).

---

3 - C'est en quelque sorte une variante de celui-ci. Le fragment monocarboné assimilé n'est pas CO_2 mais HCHO, et le composé accepteur n'est pas le 1,5-ribulose-diphosphate, mais le monophosphate.



Le cycle de la sérine

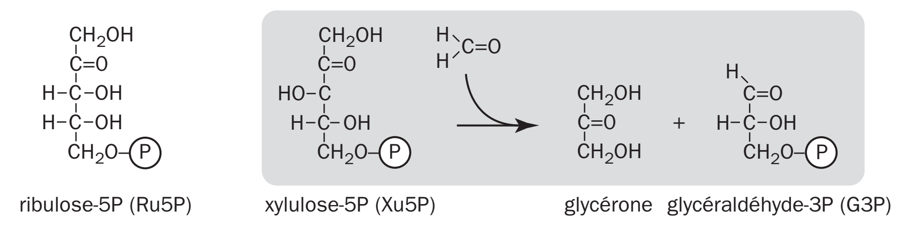
Les étapes enzymatiques importantes ont été indiquées en abrégé. À la suite de la STHM interviennent la sérine:glycine aminotransférase (SGAT), l'hydroxypyruvate réductase (HPR) et la glycérate kinase (GK). Le métabolisme du 3-phosphoglycérate suit un cheminement classique jusqu'à l'acétyl-CoA. Une molécule sur deux de phosphoénolpyruvate (PEP) est carboxylée par la PEP carboxylase (PEPC) **[29]**, une enzyme qu'on trouve aussi dans les plantes dites C4. On constatera que cette opération ne correspond pas ici à une assimilation de CO_2, car celui-ci est produit par la décarboxylation du pyruvate. La fermeture du cycle consiste à régénérer le glyoxylate. Une partie est engendrée par la malyl-CoA lyase (MCL), et l'autre par les transformations de l'acétyl-CoA par le chemin classique du citrate (par la citrate synthase) et de l'isocitrate. L'enzyme clé est alors l'isocitrate lyase (ICL) dans ce qu'on appelle couramment le shunt glyoxylique, l'isocitrate étant scindé en glyoxylate et succinate.

Le bilan des oxydoréductions de cette série réactionnelle est globalement nul. Ce n'est pas étonnant du fait que le niveau d'oxydation du formaldéhyde est proche de celui du carbone dans la cellule. La facture énergétique en ATP est modique. Une part revient à l'activation du formaldéhyde en méthylène-FH4 (substrat de la première étape catalysée par la STHM), une autre à la phosphorylation du glycérate. Une molécule d'ATP est restituée par le passage du PEP au pyruvate. On peut donc considérer que ce cycle d'assimilation du formaldéhyde est relativement très

performant. Les bactéries de type II ne pratiquent pas le cycle de CALVIN d'assimilation de CO_2 et n'ont pas de Rubisco. Mais elles ont la possibilité d'assimiler l'azote de l'air par une nitrogénase, dont les bactéries de type I sont dépourvues.

Les bactéries de type I et II se répartissent donc en deux groupes distincts qui diffèrent à la fois par leurs propriétés métaboliques, leurs potentialités physiologiques et leur origine évolutive. Les méthanotrophes de type I se développent plus facilement en présence d'un faible taux de CH_4, tandis que le type II préfère davantage de méthane plus fort et des taux plus faibles d'O_2, d'azote organique et de cuivre. Ces différences contribuent à régler la répartition des méthanotrophes dans l'environnement. Ainsi la rhizosphère des plantes aquatiques contient surtout des méthanotrophes de type II, là où il y a beaucoup de méthane et un peu d'oxygène apporté par la plante. C'est le cas des lentilles d'eau (*Lemna minor*) flottant à la surface des mares et des étangs, et des jacinthes d'eau (*Eichornia crassipes*) qu'on voit envahir les plans d'eau et les rivières dans les pays chauds. Ces végétaux sont souvent gênants par leur prolifération, mais participent indirectement au recyclage du méthane et à la dépollution. On a noté que les méthanotrophes de type II avaient de fortes potentialités pour dépolluer l'environnement, notamment en oxydant le trichloroéthylène (TCE).

L'abondance des **levures méthylotrophes** dans les sols a déjà été signalée. Elles sont avides de profiter de la dégradation des substances pectiques. Leur métabolisme du méthanol diffère de celui des bactéries. Une première différence est de mettre à contribution les peroxysomes de la cellule. La seconde est de transformer le formaldéhyde par un cycle du xylulose-5-phosphate (Xu5P). La réaction clé indiquée par le schéma est catalysée par une dihydroxyacétone synthase (EC 2.2.1.3), qui est une cétolase particulière.



Dihydroxyacétone synthase

La glycérone ou dihydroxyacétone est phosphorylée en dihydroxyacétone phosphate. Celui-ci avec le glycéraldéhyde-3P sont métabolisés par les voies classiques. Des réarrangements en série régénèrent cycliquement le xylulose-5P, avec des étapes communes à la voie des pentose-phosphates ou au cycle de CALVIN.

L'oxydation des molécules monocarbonées (méthane, méthanol, formaldéhyde) met donc en jeu une biochimie particulière dont les répercussions sur l'environnement sont considérables. Pour terminer cette section en faisant un peu diversion, on citera une question qui peut n'avoir qu'une importance assez marginale dans la défense de la biosphère, mais l'histoire mérite tout de même d'être contée, car elle met en scène des associations intéressantes en milieu marin à grande profondeur.

Des programmes de recherche ont été financés aux États-Unis par la NASA pour étudier l'adaptation des êtres vivants au méthane tellurique dégagé au fond des mers. Le méthane produit par voie biologique présente un déficit isotopique en carbone-13, et l'on peut donc déterminer grâce à cette "signature" si le méthane est effectivement produit par des êtres vivants. Dans les grands fonds océaniques, l'absence de lumière rend impossible toute photosynthèse et la vie ne peut se développer qu'en tirant de l'énergie de réactions chimiques. Le long d'accidents tectoniques et de fissures, la circulation de l'eau de mer entraîne des constituants du manteau basaltique. Les émanations hydrothermales apportent des gaz riches en hydrogène sulfuré. Ce dernier est oxydé par des bactéries et leur sert de source d'énergie. Plusieurs espèces de mollusques et de vers spécialisés s'établissent autour des sources hydrothermales des grands fonds. Leurs tissus renferment des bactéries symbiotiques, qui sont couramment des organismes utilisateurs de sulfure (dits thio-autotrophes), c'est-à-dire des germes capables d'assimiler le dioxyde de carbone grâce à l'énergie fournie par l'oxydation des sulfures. Les vers marins du genre *Riftia* isolés près des souffleurs volcaniques sous-marins présentent une telle association. Au cours de leur développement, ils perdent leur tube digestif et sont rapidement colonisés par des bactéries autotrophes tirant leur énergie de l'oxydation des sulfures. L'animal livre aux bactéries qu'il héberge l'oxygène et le gaz carbonique dont elles ont besoin, en utilisant pour cela plusieurs hémoglobines. Le ver tire sa propre énergie à l'aide de ses mitochondries tout en profitant des matières organiques produites par les bactéries. Celles-ci les ont produites à partie du CO_2 assimilé. Tout se passe donc comme si l'animal tirait son carbone du CO_2, et la déviation du rapport isotopique du carbone en apporte la preuve.

Il y a d'autres faits étonnants de ce genre. On connaît aussi des "souffleurs froids" ramenant de grandes quantités de méthane et permettant le développement de la vie. Au fond du golfe du Mexique au large de la Louisiane ont été découvertes des moules particulières (*Calyptogena*) qui renferment une grande quantité de méthanotrophes symbiotiques au niveau de leurs branchies. On a pu montrer que l'animal héberge des bactéries dans ses tissus et s'en nourrit. Les molécules organiques qu'il synthétise sont appauvries en carbone-13, ce qui montre qu'elles tirent leur origine d'un méthane de source biologique. Les méthanotrophes symbiotiques fabriquent une série de composés insaturés de structure apparentée à celle des stérols et du cholestérol. Or les bactéries ne font pas de cholestérol, qui est l'apanage des eucaryotes. Tous ces composés, y compris le cholestérol fait par l'animal, ont été trouvés déficients en carbone-13. On a pu en déduire que le mollusque faisait son cholestérol en profitant de certains précurseurs intermédiaires (hopanoïdes, méthyl-stérols) synthétisés par les bactéries méthanotrophes symbiotiques à partir du méthane récupéré dans le milieu. D'autres prélèvements faits à grande profondeur ont permis de récolter des moules hébergeant à la fois des méthanotrophes et des thio-autotrophes. Elles ont été récoltées à 3476 m de profondeur sur la dorsale médio-atlantique par le sous-marin expérimental ALVIN. On y détecte à la fois la méthanol déshydrogénase caractéristique des méthanotrophes et la Rubisco, l'enzyme clé du cycle de CALVIN. Une situation biologique exceptionnelle où apparaît une double symbiose **[30]** entre un animal et deux espèces procaryotiques différentes !

La découverte de telles relations biologiques dans des environnements considérés comme hors du commun suscitent de nombreuses spéculations. Une hypothèse consiste à voir les organismes découverts comme des reliques de formes ancestrales qui auraient été évincées partout dans la biosphère, mais préservées à des endroits privilégiés. Une autre interprétation voit les formes vivantes bizarres comme le résultat d'une évolution régressive partant d'organismes communs sur lesquels se serait exercée une pression sélective importante. Ainsi la colonisation des grandes profondeurs aurait nécessité une adaptation poussée par transformation d'espèces ordinaires. Cette question suscite actuellement un courant de recherche fascinant.

3.4 - MÉTHANOTROPHES CONTRE ORGANOCHLORÉS

Les méthanotrophes détenteurs de méthane mono-oxygénase soluble sont capables d'éliminer une grande variété de produits comprenant des xénobiotiques. Les bactéries compétentes sont en général de type II ou X. Les méthanotrophes de type II assimilent le carbone du formaldéhyde et du CO_2 par le cycle de la sérine. Ils contribuent à décontaminer les sols pollués par des solvants organochlorés comme le trichloroéthylène (TCE), le 1,2-dichloroéthane et le chloroforme. Les organochlorés sont consommés en grande quantité car ils ont l'avantage d'être d'excellents solvants, de coût modique, stables et peu inflammables. On les rencontre dans les activités de dégraissage, dans la fabrication des matières plastiques, dans les procédés d'extraction (comme dans la fabrication du café décaféiné), dans le contrôle des parasites et des champignons, et enfin comme anesthésiques. Des produits chlorés de ce type apparaissent fortuitement au cours de la purification de l'eau par chloration.

Comment ces solvants organochlorés sont-ils transformés dans les milieux contaminés ? Le principe de base de leur élimination diffère selon que les conditions sont aérobies ou anaérobies. Lorsqu'elle est réalisée, l'élimination de l'halogène se fait toujours sous forme d'ions chlorure. La partie carbonée du substrat est soit minéralisée jusqu'au stade du CO_2, soit convertie en produits secondaires récupérés par d'autres organismes. Toute dégradation complète est facilitée par deux conditions. La première est celle du **cométabolisme**. Le substrat chloré n'assure pas la croissance du germe par lui-même. Il faut qu'une autre source carbonée soit transformée par un arsenal enzymatique peu spécifique qui traite le substrat chloré dans la foulée **[31]**. Par exemple le trichloroéthylène et le chloroforme sont dans ce cas. L'apport de germes compétents sur le terrain pollué ne sera généralement pas suffisant pour obtenir un nettoyage efficace. Il faudra prévoir l'introduction de sources nutritives supplémentaires, notamment du méthane pour stimuler les méthanotrophes. En somme on lutte contre une pollution néfaste par une deuxième pollution qui a l'avantage d'être inoffensive. La seconde condition pour une dégradation complète est le développement d'**associations bactériennes**. L'élimination d'un xénobiotique est souvent impossible avec un seul germe. Un méthanotrophe de type II apporte une contribution qui sera complétée

par d'autres organismes comme un *Hyphomicrobium*. La pièce maîtresse de départ est évidemment la méthane mono-oxygénase soluble. L'enzyme a été examinée en détail chez *Methylosinus trichosporium*. Nous savons que cette enzyme à trois composants contient un noyau bi-métallique dans son site actif.

Si on se reporte au cycle catalytique de la méthane mono-oxygénase indiqué plus haut, on voit que chaque noyau bi-métallique Fe–O–Fe lie O_2 après avoir subi une réduction. L'opération fait exploser la molécule d'oxygène diatomique et libère une molécule d'eau. Un atome d'oxygène reste alors sur le centre bi-métallique, qui devient une entité extrêmement réactive et stabilisée par résonance, symbolisée sur le schéma par les trois formules mésomères **[32]**. L'attaque du TCE serait de nature radicalaire.

Oxydation du TCE par la méthane mono-oxygénase

Il apparaît deux produits de transformation du TCE, l'époxyde de trichloroéthylène (à droite sur la figure) et l'hydrate de chloral. L'époxydation est majoritaire et emporte 95% de la transformation. Il n'y a donc pas de déchloration à ce stade. Ce n'est pas le seul inconvénient. Quand on a voulu utiliser un méthanotrophe tel que *Methylosinus* pour éliminer le TCE des sols contaminés, il a fallu se rendre compte que l'efficacité n'était pas toujours au rendez-vous. En effet, le TCE par lui-même ne peut pas assurer la croissance des bactéries et le véritable substrat de croissance, qui est le méthane, entre en compétition avec le TCE pour l'oxygénase. Il en résulte une baisse de rendement, mais plusieurs solutions existent pour y pallier.

La première méthode consiste à obtenir des associations de germes, où des *Pseudomonas* et bactéries apparentées éliminent le chloral et l'époxyde. Le chloral est oxydé en trichloro-acétate, qui est métabolisé en oxaloacétate et autres dérivés par un mécanisme connu chez un *Pseudomonas* **[33]**. L'époxyde est transformé à

son tour par la méthane mono-oxygénase et la toluène 2-mono-oxygénase appartenant à des *Pseudomonas*. L'efficacité tend à rester incertaine, à cause des dégâts causés par la réactivité de l'époxyde. La deuxième solution consiste à isoler des méthanotrophes dont les performances ont été améliorées par mutation. Cette voie a été explorée par FICH et coll. **[34]**. Ces auteurs ont tout simplement sélectionné un mutant de *Methylosinus trichosporium* qui avait perdu toute sensibilité au cuivre (sans doute par déficience du transporteur spécifique), ce qui lui permettait de fabriquer la mono-oxygénase soluble dans toutes les conditions. La troisième voie relève du génie génétique. Il s'agit de cloner le groupe de gènes codant pour la mono-oxygénase dans une autre espèce, elle-même dotée de potentialités supplémentaires. JAHNG et WOOD ont logé les gènes de *Methylosinus* dans un plasmide, lui-même introduit dans un *Pseudomonas putida* **[35]**. Les bactéries modifiées transformaient le TCE un peu moins vite que le méthanotrophe de départ. L'attaque restait partielle (40%), mais ne subissait aucune inhibition par le cuivre. Toute compétition avec le méthane était absente. En outre ce *Pseudomonas* minéralisait très activement le chloroforme.

La dépollution aérobie de solvants chlorés comme le TCE n'est pas propre à la méthane mono-oxygénase. Elle est réalisée généralement par des enzymes très peu sélectives. Nous la retrouverons au Chapitre 8 avec la toluène dioxygénase et la toluène 2-mono-oxygénase. Cette dernière a des similitudes avec l'oxygénase du méthane par sa structure et l'existence d'un noyau de type Fe–O–Fe dans chaque site catalytique. L'enzyme oxyde aussi le TCE en époxyde, qu'il transforme à nouveau en dichloro-acétate **[36]**.

Les vertus des méthanotrophes ont rapidement fait germer l'idée d'une utilisation pratique. Il s'agissait de favoriser le développement des bactéries dans des conditions où la méthane oxygénase soluble était fonctionnelle. Pour aboutir à ce résultat, il fallait bien sûr leur fournir du méthane, ainsi que des sources d'azote et de phosphore. Les polluants étaient destinés à être oxydés en même temps que la source carbonée principale par cométabolisme. Un procédé a été développé par une firme américaine [4], consistant à injecter horizontalement au-dessous de la nappe phréatique un mélange d'air et de méthane à faible concentration (moins de 5%) afin d'éviter tout risque d'explosion. Les gaz diffusés étaient recueillis au-dessus de la nappe aquifère. Une décontamination efficace était obtenue en quelques semaines avec un coût réduit [5]. Quelques difficultés peuvent surgir dans cette opération. Le méthane industriel doit être débarrassé de toutes traces d'acétylène car celui-ci inhibe l'oxygénase du méthane. Il faut veiller ensuite à favoriser la multiplication des bactéries. On doit donc ajouter une source de phosphore et d'azote. Si cela ne s'avère pas suffisant, on instille dans le sol des bactéries compétentes. Les ingénieurs ont injecté en mélange à l'air du triéthyl-phosphate (un composé volatil) à 0,07% et de l'oxyde nitreux 0,007%. Afin d'éviter l'effet de compétition par le méthane, celui-ci est injecté à raison de 4% de façon

4 - *Westinghouse Savannah River Co.*

5 - *D'après un rapport d'expertise de T.C. HAZEN et coll. (1995); la société est à Aiken (North Carolina) et a fait breveter son procédé en 1995. Voir : S.M. PFIFNER et coll.(1997) J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* ***18*** *: 204-212.*

discontinue : des injections de méthane pendant plusieurs heures alternent avec l'emploi d'un mélange gazeux sans méthane. La première phase stimule la croissance des bactéries, alors que la seconde favorise la destruction des matières polluantes. Une épuration des produits indésirables a été réalisée ainsi après une période de quelques jours à quelques semaines. L'utilisation des méthanotrophes à des fins pratiques ne fait que reproduire certaines conditions naturelles où sont éliminés une foule de composés à un seul atome de carbone ou portant des groupes méthyle : dérivés de la choline, sulfure de méthyle, bromure de méthyle, Carbofuran (un pesticide) et beaucoup d'autres, sans oublier la destruction, comme nous l'avons vu, du trichloroéthylène et de divers hydrocarbures halogénés.

En résumé, l'oxydation biologique du méthane est une propriété répandue, caractérisée par une biochimie particulière, pratiquée par des germes divers qui sont susceptibles de faire des biodégradations performantes comme la destruction du TCE et d'autres produits. Leur fonction écologique dans l'environnement semble considérable et donne lieu à des applications pratiques intéressantes. La section suivante est consacrée plus particulièrement aux halométhanes en général.

3.5 - HALOMÉTHANES

Les dérivés mono-halogénés du méthane sont en majorité des produits naturels présents dans l'atmosphère. On les accuse de contribuer à la destruction de la couche d'ozone. Le plus abondant est le **chlorométhane** (CH_3Cl), soit environ 0,0006 ppmv. Cela peut paraître bien peu, mais représente tout de même 5 millions de tonnes dans l'atmosphère terrestre avec une demi-vie estimée à 1,2 année. Beaucoup plus faibles sont les taux de CH_3Br et CH_3I, mais le premier est bien plus réactif par ses effets sur la couche d'ozone, qui sont presque aussi importants que ceux de son homologue chloré **[37]**. L'action sur la couche d'ozone est le résultat d'une chimie radicalaire complexe. Par exemple CH_3Cl subit en présence de radicaux hydroxyle une photolyse qui génère du monoxyde de chlore (ClO) et du chlore atomique (Cl) transportés dans la stratosphère. Ces entités réagissent avec l'**ozone** qui fait retour à O_2. Le résultat global est alors : $2\ O_3 \rightarrow 3\ O_2$. La plus grande partie est produite par les océans, par la combustion du bois ou sa décomposition par des champignons. Les plantes émettent un peu de chlorure de méthyle, par exemple les tubercules de pomme de terre **[38]**. On estime que les émissions de CH_3Cl et CH_3Br d'origine humaine sont relativement faibles, à peine quelques pour cent du total [6]. Il existe donc une destruction naturelle de la couche d'ozone, dont le mécanisme et l'importance sont encore matière à controverse. Mais l'intervention humaine s'est manifestée surtout par l'émission des chlorofluorocarbones ou CFC, qui ont donc renforcé de façon alarmante un processus naturel. La couche d'ozone est surveillée quasi quotidiennement par les

---

6 - *Elle est plus importante, tout en restant minoritaire, dans le cas du bromure, utilisé comme désinfectant par fumigation. L'iodure de méthyle semble beaucoup moins important à cause de son temps de séjour qui reste bref (quelques jours).*

stations scientifiques de l'Antarctique. L'importance de cette diminution d'ozone dans cette région du globe loin des principaux foyers d'activité humaine semble due au régime climatique très froid et ses variations pourraient être naturelles. Le problème n'est toujours pas résolu et déborde sur des controverses scientifiques, économiques, politiques et médiatiques.

Revenons au chlorure de méthyle ou chlorométhane. Quelles sont les sources naturelles des halométhanes ? Il semble que les principaux producteurs soient des organismes marins du plancton, des algues, et des plantes halophiles du littoral (*Salicornia*, *Spartina*). Des estimations quantitatives faites sur des marais salants californiens confirment l'intervention des végétaux halophiles **[39]**. Les champignons et divers végétaux terrestres font couramment des halocarbones. Par exemple les champignons des genres *Fomes* et *Phellinus* libèrent du CH_3Cl, qui est peut-être un agent de défense. Cette production a été observée aussi chez *Mesembryanthemum crystallinum* ou Herbe à Glace (une petite ficoïdacée décorative utilisée dans les rocailles) et les tubercules de pomme de terre fraîchement récoltés **[40]**. Les halométhanes ont plusieurs origines. On en connaît au moins deux. La première est fondée sur l'action d'une peroxydase spécialisée, ou haloperoxydase. Un ion halogénure X^- est oxydé en X^+ à l'aide de H_2O_2, et l'halogène est inséré sur un accepteur RH contenant plusieurs atomes de carbone (un intermédiaire du métabolisme) selon la réaction générale **[41]** :

$$RH + X^- + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow RX + 2\,H_2O \qquad (1)$$

Les plantes et les champignons ne sont pas les seuls à générer des composés halogénés. Cette propriété a été reconnue chez diverses bactéries qui détiennent une haloperoxydase spéciale plus ou moins spécifique et contenant une flavine **[42]**. Le dérivé halogéné (RX) se décompose ensuite ici en libérant CH_3Cl ou CH_3Br. De telles haloperoxydases sont communes chez les algues et champignons, qui utilisent aussi une autre voie fondée sur un donneur de méthyle très classique dans le métabolisme, la S-adénosylméthionine ou *AdoMet**, selon :

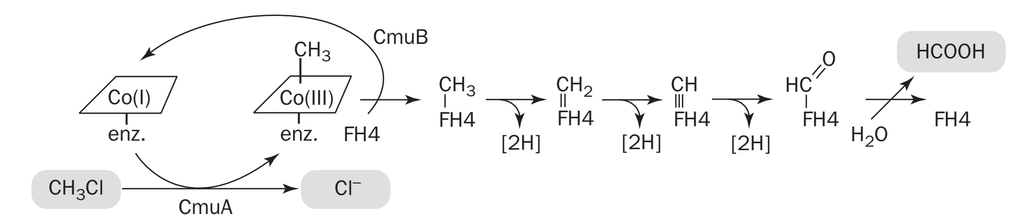
$$X^- + \text{AdoMet} \longrightarrow CH_3X + \text{AdoHCys}^{\,7} \qquad (2)$$

La petite Herbe à Glace possède ce système **[43]**, et l'enzyme est une méthyl-transférase. Le chou (*Brassica oleracea*) renferme en abondance une enzyme du même type. Le plus extraordinaire est que des bactéries utilisent CH_3Cl comme substrat de croissance malgré sa dilution dans l'atmosphère. Les méthylotrophes sont en première ligne. Plusieurs organismes méthylotrophes capables de se développer sur chlorométhane comme seule source de carbone et d'énergie ont été isolés. L'un d'eux est un homo-acétogène strictement anaérobie (*Acetobacterium dehalogenans*), d'autres sont des méthylotrophes aérobies des genres *Hyphomicrobium* et *Methylobacterium*. On s'arrêtera ici aux seuls aérobies. À cause de la dilution du substrat dans l'air ambiant, on imagine mal que les bactéries puissent se nourrir autrement que par le chlorure de méthane produit *in situ* dans le sol par les champignons et les plantes, dans des environnements minuscules où le gaz est plus concentré.

---

7 - S-adénosylhomocystéine.

L'assimilation de CH_3Cl peut se faire avec ou sans cométabolisme par oxydations successives. En anaérobiose, *Acetobacterium dehalogenans* récupère le groupe méthyle pour en faire du méthyl-FH4 **[44]**. C'est un intermédiaire que nous connaissons après avoir examiné le métabolisme des acétogènes, et il nous fera faire un petit retour en arrière. Le méthyl-FH4 fait partie de la voie de l'acétyl-CoA ou voie de WOOD, qu'on trouve aussi chez les méthanogènes. Le *Methylobacterium* souche CM4, un méthylotrophe aérobie étudié par VANNELLI et coll. **[45]** (chapitre 4), utilise le chlorure de méthyle comme seule source de carbone et d'énergie par un mécanisme qui ressemble curieusement à celui des acétogènes et des méthanogènes. Cependant le résultat des transformations n'est pas l'acétyl-CoA mais le formiate. Le rendement de croissance est élevé, soit 2,8 g de protéine cellulaire par mole de substrat carboné. Des oxydations du bromométhane et du fluorométhane par les méthanotrophes ont été également observées. Pour *Hyphomicrobium chloromethanicum*, CH_3Cl est également utilisable comme seule source de carbone et d'énergie et donne lieu à un métabolisme similaire dont un dessin montre le principe **[46]**.



Oxydation du chlorure de méthyle par Methylobacterium

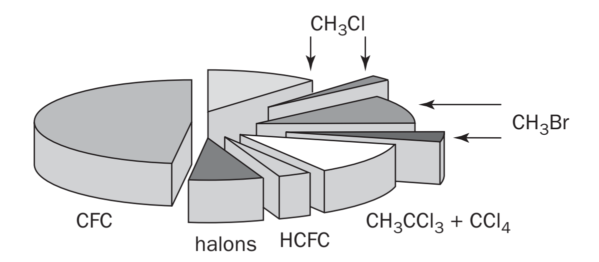
Les deux premières étapes sont catalysées par les méthyl-transférases CmuA et CmuB, utilisant un **corrinoïde**. On pourra comparer le mécanisme avec celui des acétogènes. Les opérations se déroulent ici en sens inverse. Elles sont déduites des résultats obtenus avec des extraits acellulaires. Le méthyle est greffé sur le cobalt quand celui-ci passe de l'état Co^{I} à Co^{III}, puis déchargé sur le **tétrahydrofolate** (FH4) pour produire le méthyl-FH4. Observons ici les différentes oxydoréductions réalisables sur le FH4, avec à la sortie le formyl-FH4 et le formiate. Les trois oxydations successives sont symbolisées par [2H] [8]. Cette voie conduisant au formiate est un métabolisme énergétique. Comme les bactéries ont également besoin d'une source de carbone, elles prélèvent celui-ci au niveau de méthylène-FH4, qui alimente le cycle de la sérine décrit antérieurement. L'intervention d'un corrinoïde est assez exceptionnelle chez des organismes ayant un mode de vie aérobie. Chose intéressante, la protéine CmuA a des analogies reconnaissables avec la méthionine synthase du colibacille. Cette enzyme représente une étape clé du métabolisme des éléments monocarbonés (voir *méthionine**). Une ressemblance significative au niveau d'une portion de séquence a été trouvée avec une méthyl-transférase appartenant à un méthanogène (*Methanosarcina barkeri*). Il y a plus étonnant encore. Un autre *Methylobacterium* (*M. extorquens* AM1) utilise en

8 - *On reconnaît successivement les stades méthyl-FH4, méthylène-FH4, méthényl-FH4 et formyl-FH4.*

plus du FH4 une tétrahydro-méthanoptérine très proche de celle que les méthanogènes mettent en jeu au cours de la réduction de CO_2 en méthane **[47]**. On croyait antérieurement que ce cofacteur était strictement réservé aux archaebactéries méthanogènes et réductrices de sulfate. Cette trouvaille laisserait supposer que les gènes impliqués dans la méthylotrophie et la méthanogénèse ont une origine commune très ancienne, avec le même schéma directeur dans la gestion métabolique des éléments monocarbonés entre bactéries aérobies et archaebactéries strictement anaérobies. Chose intéressante, l'assimilation du CH_3Cl par les méthylotrophes donne lieu à une diminution du rapport $^{13}C/^{12}C$ de même ordre de grandeur que celui de la méthanogénèse. Le déficit en carbone-13 est de l'ordre de 7% par rapport au réservoir carboné de départ. On suppose évidemment que le mécanisme de base mis en jeu est similaire **[48]**.

Il existe donc un cycle des halogénures de méthyle dans la nature, le principal étant celui du CH_3Cl. Un équilibre dynamique, dont les paramètres ne sont pas entièrement connus, s'établit entre la production biologique de ces halogénures et leur oxydation par les bactéries méthylotrophes du sol. Le métabolisme de celles-ci présente une ressemblance troublante avec celui de certaines archaebactéries. La méthyltransférase à corrinoïde retient particulièrement l'attention. Sa spécificité est assez large. Elle peut catalyser un va-et-vient de méthyle entre un donneur et un accepteur, utilisant CH_3Cl, CH_3Br ou CH_3I pour méthyler toute une panoplie d'accepteurs: halogénures, nitrite (NO_2^-), cyanure (CN^-), thiocyanate (SCN^-) et hydrosulfure (HS^-) !

L'industrie humaine n'a fait que contaminer l'environnement par de nouveaux éléments monocarbonés sous la forme des **chlorofluorocarbones** proprement dits et des **halons**.



Le diagramme montre la répartition en équivalents chlore des gaz halogénés de la troposphère, d'après des mesures faites en 1999 et rapportées par BUTLER **[49]**. Sont représentées en blanc les parts attribuées aux émissions naturelles. Les autres, en grisé, proviennent de l'activité humaine et représentent 77% du total (certaines abréviations sont redéfinies en glossaire). On estime que les CFC ont un temps moyen de rémanence élevé dans l'atmosphère, de l'ordre de 60 à 100 ans. Les plus connus sont le fréon-11 (CCl_3F) et le fréon-12 (CCl_2F_2), utilisés dans les réfrigérateurs et les climatiseurs, et maintenant bannis. On a tenté de les remplacer par les HCFC (hydrochloro-fluorocarbones). Leur temps de résidence est calculé d'après la cinétique de réaction avec le radical hydroxyle. Il serait de 15 ans et on les suppose moins nocifs pour la couche d'ozone **[50]**. L'un d'eux est le HCFC-21

($CHCl_2F$). Ils seraient plus susceptibles à une dégradation biologique. L'attaque aérobie de plusieurs HCFC dans le sol à l'état de traces a été détectée et les responsables probables sont là encore des méthanotrophes **[51]**. Par contre les CFC paraissent réfractaires à toute attaque anaérobie et ne sont dégradés à la rigueur que par les méthanogènes, sans doute par déshalogénation réductrice. Cette transformation apparaît clairement dans le cas du fréon-11 par *Methanosarcina barkeri* **[52]**. La question semble progresser assez peu actuellement.

Les halons regroupent un certain nombre de gaz utilisés dans les extincteurs. En font partie le perfluoro-propane (C_3F_8), le perfluoro-butane (C_4F_{10}), le trifluoro-iodo-méthane (CF_3I), et un certain nombre de composés à 1-4 atomes de carbone, contenant du chlore et du fluor, par exemple le chlorotétrafluoroéthane ($CHFCl–CF_3$). Il est vraisemblable que la fabrication de ces gaz sera totalement interrompue à la suite des conférences internationales. On cherche à les remplacer par des hydrocarbures chlorés qui seraient sans danger sur la couche d'ozone. Sont également catalogués abusivement comme halons des mélanges gazeux qui n'ont rien à voir avec les organo-halogénés, comme le dioxyde de carbone, l'argon et l'azote, utilisés aussi dans les extincteurs ou les bombes aérosols.

3.6 - L'OXYDATION DE L'AMMONIAC

Cette question, dont on a déjà fourni quelques éléments, complète logiquement l'oxydation du méthane, car l'ammoniac, dégagé en abondance par les décompositions de matière organique animale ou végétale, est oxydé par une oxygénase dont nous connaissons les analogies avec l'enzyme membranaire du méthane. L'oxydation de l'ammoniac dans l'environnement reste enveloppée d'incertitudes. Aussi est-ce un sujet difficile mais important. L'ammoniac est très toxique pour les êtres vivants et son caractère volatil faciliterait son évasion dans l'atmosphère, si ce n'est qu'à pH neutre dans les sols et les eaux, il est essentiellement à l'état d'ion ammonium NH_4^+ (le pK_a est 9,1 à 30°C). Son oxydation aérobie jusqu'au stade nitrate, la principale ressource azotée des plantes vertes, s'appelle **nitrification** et se fait en deux étapes.

La première est la transformation de NH_3 (ou NH_4^+) en nitrite (NO_2^-) chez *Nitrosomonas* par l'ammoniac mono-oxygénase (1) et l'hydroxylamine oxydoréductase (2) :

$$NH_3 + O_2 + NADH + H^+ \longrightarrow NH_2OH + NAD^+ + H_2O \qquad (1)$$

$$NH_2OH + H_2O \longrightarrow NO_2^- + 4\,e^- + 5\,H^+ \qquad (2)$$

La seconde étape transforme le nitrite en nitrate chez *Nitrobacter* :

$$NO_2^- + O_2 + NADH + H^+ \longrightarrow NO_3^- + H_2O + NAD^+ \qquad (3)$$

Les végétaux disposent de l'azote minéral sous forme ammoniacale ou nitratée, avec une préférence de nombreuses espèces pour la seconde. Beaucoup de plantes cultivées peuvent utiliser indifféremment ces deux sources azotées. Il en est de même pour les espèces pionnières sur terrain difficile. Le taux d'assimilation de

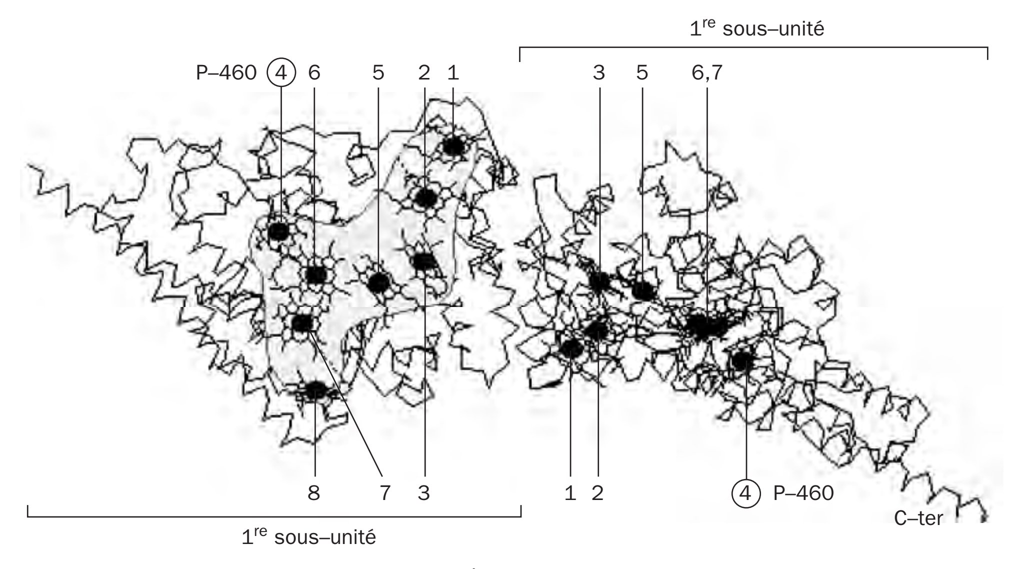
l'ammonium par rapport à celui du nitrate est alors proche de l'unité **[53]**. La toxicité de NH_4^+ entraîne la préférence de nombreuses plantes pour le nitrate. Inversement le riz, les bruyères et les conifères se contentent de sols enrichis en ammonium et matières organiques, et résistent bien à la toxicité ammoniacale. Cette question a une grande importance en économie forestière. Des arbres comme les épicéas croissent mieux sur ammonium que sur nitrate. Ils se contentent donc facilement de sols où la nitrification est faible. Par contre si celle-ci augmente à la suite d'un changement des conditions, la montée des nitrates peut gêner la réimplantation de ces arbres. Ce problème a fait l'objet d'études par des auteurs nord–américains **[54]**. Des facteurs supplémentaires sont à considérer, comme le prélèvement azoté par la microflore du sol et les mycorhizes, dont la préférence va vers l'ammonium. L'économie azotée du monde végétal est donc sous la dépendance d'influences complexes dont la nitrification n'est que l'un des éléments. La nitrification est un facteur de fertilisation des milieux naturels pour de nombreuses plantes, mais contribue à régler la répartition des espèces en fonction de l'apport azoté et du rapport NH_4^+/NO_3^-. Il y a trois stades à considérer : l'oxydation de l'azote ammoniacal en hydroxylamine, le passage au nitrite, l'oxydation du nitrite en nitrate. Ces réactions sont aérobies.

Nitrosomonas europaea catalyse les deux premières étapes. C'est un Gram-négatif appartenant au groupe des β-protéobactéries, vivant en autotrophie avec une croissance très lente, son temps de génération étant d'au moins 7 heures dans les conditions optimales. La première réaction (1) est catalysée par l'**ammoniac mono-oxygénase** (AMO) codée par trois gènes formant un l'opéron *amoAB*. Elle utilise NADH et consomme de l'énergie. L'énergie est apportée par la réaction (2), catalysée par l'**hydroxylamine oxydoréductase** (HAO, EC 1.7.3.4) associée à une chaîne de transporteurs d'électrons.

L'ammoniac mono-oxygénase (AMO), est construite sur le même modèle que la méthane mono-oxygénase membranaire des méthanotrophes, comme l'a suggéré une comparaison entre leurs gènes **[55]**. Son substrat est $\mathbf{NH_3}$ et non pas l'ion ammonium. Elle oxyde aussi mais plus faiblement le méthane. Nous savons qu'elle oxyde aussi un peu l'ammoniac. L'AMO est inhibée sélectivement par la nitrapyrine et oxyde une riche palette de substrats comme le fait l'enzyme du méthane. En somme il y a bien une sorte de cousinage entre les deux enzymes, qui à défaut d'une forte homologie de séquence ont beaucoup de caractères communs et pourraient avoir évolué à partir de la même solution ancestrale. Lorsque l'AMO attaque des substrats secondaires, comme des composés organiques halogénés, elle ne peut le faire que parallèlement à l'oxydation de l'ammoniac, qui apporte l'énergie nécessaire. Toute chute du taux d'oxygénation de l'ammoniac entraîne de fait une baisse de l'activité dépolluante de l'enzyme. Comme l'ammoniac mono-oxygénase est une enzyme clé du cycle de l'azote, toute inhibition de son action pourrait avoir des effets pervers dans l'environnement. Or l'enzyme est fragilisée par l'étendue même de ses potentialités. L'oxydation du TCE par l'AMO engendre des intermédiaires nocifs qui réagissent avec plusieurs protéines cellulaires dont l'AMO. Il y a plusieurs critères montrant que l'oxygénase est bloquée par les produits de transformation du TCE. Tout d'abord l'inhibition définitive de l'AMO ne se produit qu'en présence d'O_2, ce qui montre que le cycle catalytique est nécessaire à cette

inactivation qui est définitive. Elle est contrebalancée dans les cellules entières par la synthèse *de novo* de nouvelles molécules d'enzyme. Un deuxième critère est l'inhibition compétitive par l'allylthiourée, qui retarde la destruction de l'enzyme en ralentissant l'oxydation du TCE. L'AMO s'empoisonne également par l'oxydation de substrats autres que le TCE. L'un d'eux est l'acétylène. La réaction de l'acétylène marqué au carbone-14 installe la radioactivité dans l'un des polypeptides de l'oxygénase, uniquement si l'oxygène est présent, et là encore l'allylthiourée protège l'enzyme contre son inactivation irréversible. Enfin un autre inhibiteur agissant à la manière de l'acétylène est le sulfure d'allyle. Son action puissante sur l'enzyme s'explique peut-être par formation d'un époxyde ou d'un sulfoxyde réactif. La formation d'un produit de ce type paraît plausible, car l'AMO transforme le diméthylsulfure en DMSO **[56]**. L'oxydation de l'ammoniac dans la biosphère est donc un mécanisme fragile relativement exigeant vis-à-vis de divers paramètres. Il est facilement empoisonné par des produits polluants.

L'hydroxylamine oxydoréductase est une enzyme étonnante et complexe. Elle a trois sous-unités identiques contenant chacune 8 **hèmes C** liés au polypeptide par le consensus courant CxxCH, le fer étant coordonné des deux côtés par l'histidine. L'un de ces hèmes est inhabituel par sa *bande SORET** à 460 nm en présence de CO, ce qui le fait désigner comme P460.

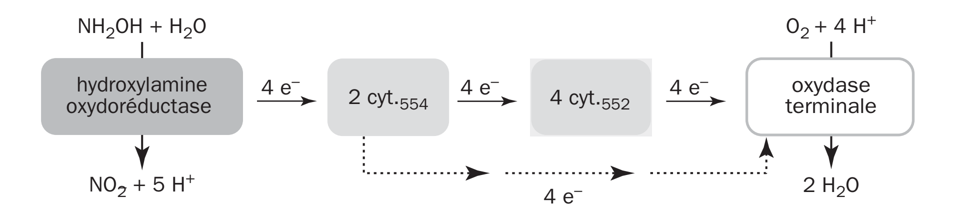


Hydroxylamine oxydoréductase (structure partielle)

Ce noyau héminique particulier est considéré comme le site actif où le fer est à haut spin et penta-coordonné, la sixième coordinence étant établie avec le substrat. L'oxydoréductase est donc dotée d'une chaîne interne de transporteurs d'électrons qui ressemble à celle qu'on trouve chez les méthanotrophes **[57]**. Le dessin représente deux des trois sous-unités de l'enzyme. Les cercles noirs sont les atomes de fer au centre des 8 porphyrines par sous-unité. Les hèmes sont numérotés de 1 à 8 en fonction de la position de leurs liens covalents avec la séquence.

Ils forment 4 groupes I, II, III et IV qui sont autant d'unités fonctionnelles au sein de la chaîne de transferts : I (4 + 6 + 7), II (3 + 5), III (1 + 2) et IV (8). L'hème n°4 est le P460 du site actif. Les potentiels s'échelonnent entre – 400 et – 100 mV, le plus bas étant celui de l'hème 8. Le P460 a une structure atypique. La porphyrine déjà attachée par deux liens covalents sur cystéine en contracte un troisième avec un résidu tyrosine de la sous-unité voisine à travers la surface de contact. La protéine n'a rien d'une fantaisie isolée dans la nature. On retrouve un P460 chez *Methylococcus capsulatus*, un méthanotrophe capable d'oxyder l'ammoniac en hydroxylamine puis en nitrite.

Les électrons sont-ils acheminés directement sur l'oxygène ou vers une oxydase terminale membranaire ? Là encore existe une longue chaîne d'hèmes C dans les cytochromes c_{554} et c_{552}.

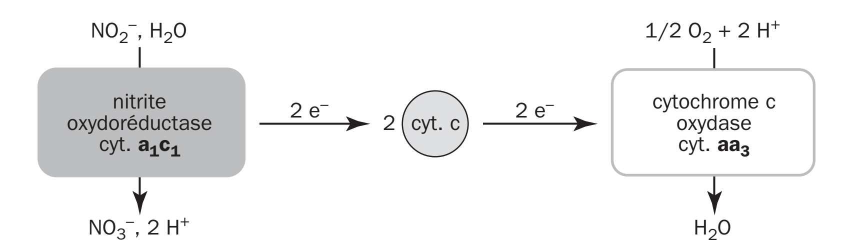


Le c_{554} est un transporteur à 4 hèmes de potentiels allant de + 47 à – 276 mV. Ils sont alignés dans un ordre qui rappelle le tronçon de séquence portant les hèmes 3 à 6 dans l'oxydoréductase **[58]**, bien qu'il n'y ait pas d'homologie de séquence entre les deux protéines. Les électrons entrent sous +47 mV sur deux hèmes dont l'un est penta-coordonné et ressemble ainsi au P460 précédent. Le c_{552} est un petit cytochrome à un seul hème qui est bâti comme celui des mitochondries animales. L'oxydase terminale rappelle celle de *Paracoccus*.

Les bactéries telles que *Nitrosomonas* ont un génome relativement petit (2 200 kb) dont la séquence complète est attendue avec intérêt car il s'agit de cellules autotrophes. Chose curieuse, les gènes de l'oxygénase, de l'oxydoréductase et des cytochromes fonctionnellement associés existent en plusieurs exemplaires de séquences pratiquement identiques **[59]**, ce qui n'est pas sans compliquer l'analyse génétique. En effet l'inactivation d'un site par mutation est facilement compensée par un autre gène de la série. La raison de cette pluralité est énigmatique. Deux gènes identiques peuvent améliorer la production de l'enzyme correspondante sur le plan quantitatif. Si la bactérie n'en tirait aucun avantage physiologique, le hasard des mutations aurait toute chance de faire disparaître le matériel génétique superflu. En réalité l'explication se situe probablement au niveau des régulations, qui conduiraient à exprimer l'un ou l'autre des gènes dans des circonstances différentes. Le pouvoir d'adaptation de la bactérie aux conditions du milieu s'en trouverait amélioré.

Nous arrivons maintenant à l'oxydation du nitrite en nitrate. La **nitrite-cytochrome c oxydoréductase** appartient aux bactéries telles que *Nitrobacter winogradskyi*, qui est le principal matériel d'étude. La protéine est héminique et contient des noyaux fer-soufre et du molybdène. Celui-ci est logé dans un cofacteur organique spécial du

type de ceux qu'on trouve dans la majorité des molybdo-enzymes. Les chefs de file en sont la xanthine oxydase et les nitrate réductases **[60]**. Il y a une certaine ressemblance ici avec la sulfite oxydase, qui catalyse une réaction assez similaire. Parce que l'oxydoréductase contient des hèmes A et C, on la désigne habituellement comme **cytochrome a_1c_1**. Les électrons sont acheminés ensuite vers l'oxygène par un cytochrome c et une cytochrome c oxydase de type aa_3 similaires à ceux des mitochondries **[61]**.



L'importance de la nitrification dans l'environnement se manifeste dans trois directions. La première est une récupération de l'azote ammoniacal et sa transformation finale en nitrate (réactions 1, 2 et 3 indiquées antérieurement), créant la principale source azotée des végétaux verts et un maillon essentiel du cycle de l'azote. La deuxième apparaît dans l'épuration des eaux lourdement chargées en ammoniac, notamment en aval des stations d'élevage industriel. L'ammoniac est toxique pour la vie aquatique, le nitrate formé est entraîné facilement et servira de support à la dénitrification dont le terme ultime est N_2. L'ensemble contribue ainsi à éliminer le trop-plein en azote. La troisième direction d'importance est celle des biodégradations amorcées en grande partie par l'ammoniac mono-oxygénase : oxydation et déshalogénation d'hydrocarbures chlorés, du TCE… L'attaque de ces différents polluants n'apporte aucun bénéfice énergétique à la cellule et ne peut se faire que conjointement à celle de l'ammoniac.

La plupart des études ont porté initialement sur *Nitrosomonas europaea* pour la transformation de NH_3 en nitrite, et sur *Nitrobacter winogradskyi* pour l'oxydation du nitrite en nitrate. Ces organismes ne sont pas les seuls à conduire la nitrification dans la nature, mais ont l'avantage d'être faciles à obtenir à partir des collections et leurs propriétés sont bien établies. Une recherche systématique des organismes nitrifiants par l'analyse des séquences d'ARN 16S et l'emploi de sondes nucléiques révèle pourtant une certaine diversité **[62]**. Les *Nitrosococcus* sont des γ-protéobactéries, tandis que les *Nitrosomonas* et un groupe de germes apparentés entre eux (*Nitrosobolus* et *Nitrosovibrio*) sont des β-protéobactéries. *Nitrospira* forme un groupe à part. L'oxydation des nitrites est réalisée par des bactéries appartenant à 4 genres, *Nitrobacter* (de la sous-classe alpha), *Nitrospina* (delta), *Nitrococcus* (gamma) et *Nitrospira*. La biologie de ces espèces est encore insuffisamment étudiée par manque de données en culture pure. Certaines sont hétérotrophes, la plupart entrent volontiers dans des biofilms où se créent des associations syntrophiques entre celles qui oxydent NH_3 et celles qui oxydent le nitrite. L'importance de certaines formes dans les boues d'épuration reste facilement inaperçue à cause de la lenteur de développement des isolats.

Des travaux récents ont montré l'importance des *Nitrospira* (*N. marina, N. moscoviensis*) dans l'oxydation des nitrites en nitrates **[63]**. Ces bactéries, qui occupent une place à part dans la phylogénèse des procaryotes, sont présentes dans une grande variété de milieux et se développent sur des concentrations de nitrite de l'ordre de 200 $mg.L^{-1}$. Elles ont une forte affinité pour les nitrites mais une croissance assez lente. Les *Nitrobacter* ont des propriétés inverses, se développent sur forte concentration de nitrite (2 $g.L^{-1}$), ont une faible affinité pour celui-ci, et se multiplient rapidement. Les premières sont dites de **type K** (pour K_m), les secondes de **type r** (pour *rate* ou vitesse) **[64]**. La juxtaposition dans l'environnement de compétiteurs K et r se développant sur le même substrat n'existe pas que pour les nitrites. Elle correspond à un certain partage des tâches et à un moteur d'évolution dans les populations [9].

La nitrification représente à petite échelle un facteur essentiel de la maintenance d'un aquarium, biotope naturel en miniature où les principaux éléments sont recyclés en vase clos. Hormis l'apport de nourriture aux poissons et les échanges gazeux avec l'atmosphère, l'aquarium garni de plantes vertes fonctionne en autarcie complète. L'azote ammoniacal en provenance des poissons et des débris végétaux est réoxydé en continu par les bactéries nitrifiantes venues coloniser le filtre. Il est bien connu des aquariophiles que l'installation d'un nouveau bac nécessite une période d'adaptation de plusieurs semaines, au cours de laquelle les nitrites sont produits plus rapidement qu'ils ne sont oxydés en nitrates. Leur teneur peut atteindre une valeur toxique pour les poissons. On accélère le processus par un ensemencement bactérien et une bonne oxygénation. Lorsque l'aquarium est "installé", le taux de nitrite doit retomber à une valeur faible. La montée des nitrates à des valeurs situées autour de 10-20 $mg.L^{-1}$ témoigne d'une bonne nitrification, mais elle doit se stabiliser grâce au développement des plantes. L'usage d'eau déminéralisée et purifiée à l'excès n'est pas forcément recommandé puisqu'il risque de faire disparaître des oligo-éléments ou d'autres composants (comme les phosphates) nécessaires à l'économie générale du bac. Les *Nitrospira* auraient un rôle essentiel dans les aquariums pour faire disparaître les nitrites au fur et à mesure, les *Nitrobacter* interviendraient davantage après une forte montée des nitrites. Un mauvais développement de ces bactéries est la source d'une montée dommageable des nitrites.

Revenons à l'oxydation de l'ammoniac. Sa transformation en nitrate repose sur un mécanisme fragile qui n'opère que dans une gamme de pH assez étroite, avec un optimum placé vers 7,5-8,5 ; elle cesse avec le froid (au-dessous de 5-10°C) et dès que l'oxygène tombe à des valeurs faibles. La nitrification risque donc d'être absente dans les sols forestiers acides ou peu aérés, et reste sensible à des actions inhibitrices variées. L'effet inhibiteur d'un pH au-dessous de la neutralité peut s'expliquer par l'équilibre entre NH_3 et NH_4^+, déjà fortement déplacé en faveur de l'ammonium à pH neutre. Or l'ammonium n'est pas le substrat de la nitrification, contrairement à NH_3. Le pH acide provoque donc une raréfaction accrue de

9 - *Une question de dynamique des populations, appliquée à la croissance cellulaire comme à l'évolution humaine, appelée par certain auteurs théorie de* RUSHTON.

l'ammoniac disponible. Il en résulte aussi des effets complexes exercés par la nature du sol. Certains constituants agissent comme échangeurs de cations et adsorbent l'ammonium, effectuant ainsi un détournement global de l'azote qui sera moins disponible pour l'oxygénation.

La nitrification conserve des aspects obscurs et les limites de son action ne sont pas encore bien cernées, ce qui est bien dommage vu l'intérêt qu'elle présente pour l'agriculture. C'est lors de l'oxydation de l'ammoniac en nitrite que son utilité dans les biodégradations apparaît au mieux, puisque l'ammoniac mono-oxygénase possède, comme l'enzyme correspondante active sur le méthane, un pouvoir de transformer une gamme étendue de substrats parmi lesquels figurent des hydrocarbures halogénés. La section suivante porte sur un aspect nouveau de l'oxydation de l'ammoniac, qui pourrait être d'une grande utilité pour le traitement des eaux.

Un aspect inédit de l'oxydation de l'ammoniac n'est connu que depuis quelques années. On pensait autrefois qu'elle était, pour des raisons évidentes, tributaire de l'oxygène. Des observations prouvant une oxydation de NH_3 en anaérobiose sont venues compliquer les choses. Elles ont été faites en bioréacteur installé pour une étude de dénitrification **[65]**. L'ammoniac est oxydé en absence complète d'O_2, en passant probablement par des stades intermédiaires comme l'hydroxylamine et l'hydrazine ($H_2N–NH_2$), le stade final étant l'azote diatomique (N_2) ! Quel est l'oxydant ? Le nitrite ou peut-être le nitrate.

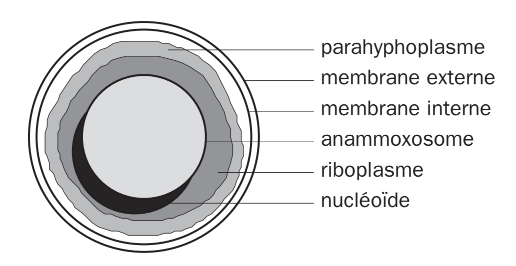
Ce nouveau mécanisme biologique a été désigné par **anammox** (*anaerobic ammonium oxidation*). Il intervient à pH 7,5-8,5, se montre encore plus lent que la nitrification aérobie. Quand l'ammoniac marqué à l'azote-15 est mis en présence de nitrite contenant l'azote-14, le N_2 formé est constitué d'un atome ^{14}N et d'un atome ^{15}N. La détection de ce diazote "hybride" peut donc servir à révéler le fonctionnement de l'anammox, qu'on pourrait symboliser par :

$$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2\,H_2O$$

Malheureusement les germes incriminés n'ont pas été clairement caractérisés, et leur croissance est extrêmement lente : une division toute les 2 à 3 semaines ! Les cellules sont autotrophes. Elles se développent dans des biofilms au contact des eaux usées chargées en ammoniac. C'est sans doute la difficulté de les obtenir en culture qui fait que beaucoup de détails sur cette question manquent encore. Une nouvelle oxydoréductase a été caractérisée à partir d'une culture anaérobie. Elle oxyde in vitro l'hydroxylamine et l'hydrazine en utilisant des accepteurs d'électrons artificiels. L'enzyme contient de nombreux hèmes. Son spectre inhabituel l'a faite désigner comme cytochrome P468. Elle ne paraît présenter aucune ressemblance avec l'enzyme correspondante de *Nitrosomonas europaea*. Cette dernière espèce, qui est en principe aérobie, possède un métabolisme qui ressemble à l'anammox en taux faible d'oxygène. Elle fait du NO par oxydation de l'ammoniac avec le nitrite. Ce processus est très lent, mais un tel chassé-croisé de réactions en milieu anaérobie ne facilite évidemment pas les analyses. En somme il y a deux voies d'oxydation différentes de l'ammoniac dans la nature. La première et la plus importante est la nitrification, une oxydation par O_2 dont le nitrate est le stade terminal

nitrate. La seconde voie est appelée anammox. Elle est anaérobie et totalement indépendante de la première. L'ammoniac est transformé en azote moléculaire, le nitrite servant d'oxydant.

Les germes responsables de l'anammox sont des bactéries atypiques du genre *Candidatus* dans le groupe spécial des planctomycètes dont la morphologie comporte une compartimentation inhabituelle. L'oxydation de l'ammoniac a lieu dans la membrane périphérique d'une particule interne entourée d'une double membrane et appelée **anammoxosome**.



Les cellules sont entourées de deux membranes, interne et externe, et d'une zone cytoplasmique périphérique dépourvue de ribosomes, trouvée chez tous les planctomycètes connus, et désignée comme le parahyphoplasme. Une région plus interne entourée d'une membrane simple ou riboplasme [10] renferme des ribosomes, un ou plusieurs nucléoïdes rendus fluorescents par le DAPI et l'anammoxosome **[66]**.

Le métabolisme de l'ammoniac s'effectue cycliquement par une nitrite réductase, une hydrazine hydrolase et une enzyme d'oxydation de l'hydrazine productrice de N_2 et non entièrement caractérisée. Ces facteurs catalysent respectivement les réactions (1), (2) et (3).

$$NO_2^- + 4\,e^- + 5\,H^+ \longrightarrow NH_2OH + H_2O \quad (1)$$

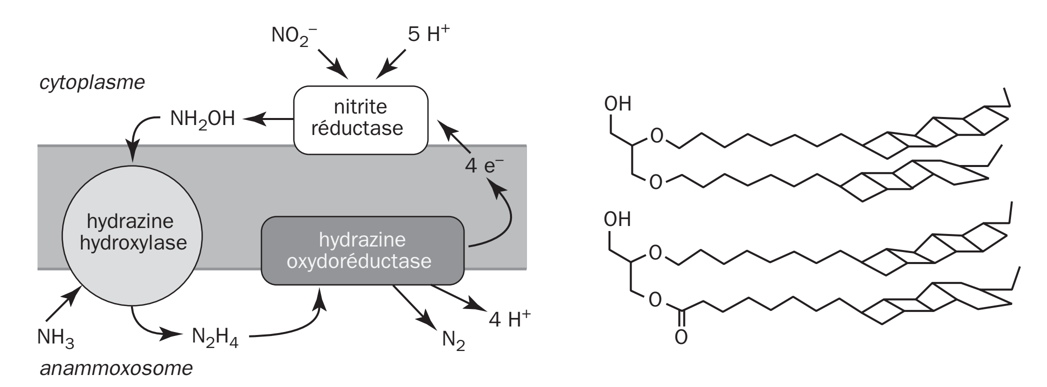
$$NH_2OH + NH_3 \longrightarrow H_2N{-}NH_2 + H_2O \quad (2)$$

$$H_2N{-}NH_2 \longrightarrow N_2 + 4\,H^+ + 4\,e^- \quad (3)$$

Sur le schéma *a* du cycle des oxydoréductions, on peut voir que des protons sont prélevés du côté cytoplasmique, d'autres sont expulsés à l'intérieur de l'anammoxosome. Il est donc possible qu'un gradient électrochimique s'établisse de part et d'autre de cette membrane, mais on ignore comment l'énergie est récupérée.

La composition biochimique de la membrane des anammoxosomes révèle des caractères extraordinaires sans équivalent connu ailleurs dans le monde vivant. On y rencontre des lipides exceptionnels appelés **ladderanes**, du mot anglais voulant dire échelle. Les chaînes hydrocarbonées sont greffées sur le glycérol par des liaisons éther ou ester, mais le détail le plus curieux est la succession de cycles à 4 et 6 atomes de carbone (cyclobutane, cyclohexane) reliés en *cis* selon les conventions chimiques usuelles. Deux exemples ont été figurés en *b*.

10 - Appelé pirellulosome dans une autre espèce, Pirellula marina.



a - Cycle des oxydoréductions *b - Exemples de ladderanes*

Certains lipides sont des esters méthyliques d'acides gras ayant la même structure bizarre. La répartition des chaînes et leur composition n'est pas quelconque. Elle a été déterminée par des auteurs néerlandais en s'aidant de la technique d'extraction et de purification partielle, marquage par anticorps, examen par fluorescence et spectrométrie de masse **[67]**.

La physiologie de ces cellules particulières reste donc énigmatique. Les anammoxosomes ont été obtenus à l'état isolé. Les ladderanes confèrent à la membrane spéciale qui les entoure une rigidité accrue par rapport aux biomembranes habituelles. Ces lipides exceptionnels ont été préparés par synthèse, s'organisent en bicouche, mais confèrent une plus grande densité à la membrane ainsi qu'une perméabilité moindre. Il est supposé que cette organisation spéciale est une adaptation contre la diffusion de l'hydrazine, qui entraînerait des pertes importantes dans le métabolisme énergétique. Il s'agit d'une adaptation de ces germes non-conformistes qui reste à découvrir. La compartimentation interne des cellules n'a encore reçu aucune explication.

3.7 - MONOXYDE DE CARBONE ET CARBOXYDOTROPHES

De grandes quantités de monoxyde de carbone, de l'ordre de 600 à 800 millions de tonnes par an sont déversés dans l'environnement. La combustion des carburants dans les moteurs et les installations thermiques a pris une part prépondérante dans les émissions de CO dans l'atmosphère. Le cinquième environ de ce gaz est oxydé assez rapidement dans les couches superficielles du sol par des bactéries aérobies. Quant au monoxyde de carbone atmosphérique, il est soumis à une **oxydation photochimique** et réagit avec les radicaux hydroxyles qu'il contribue à éponger. La présence de ces radicaux dans l'atmosphère a une grande importance pour empêcher l'accumulation de CO, d'hydrocarbures, de terpènes et autres produits volatils. L'ozone en est une source principale.

En conditions aérobies, le CO est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie par les bactéries dites **carboxydotrophes** dispersées dans des groupes

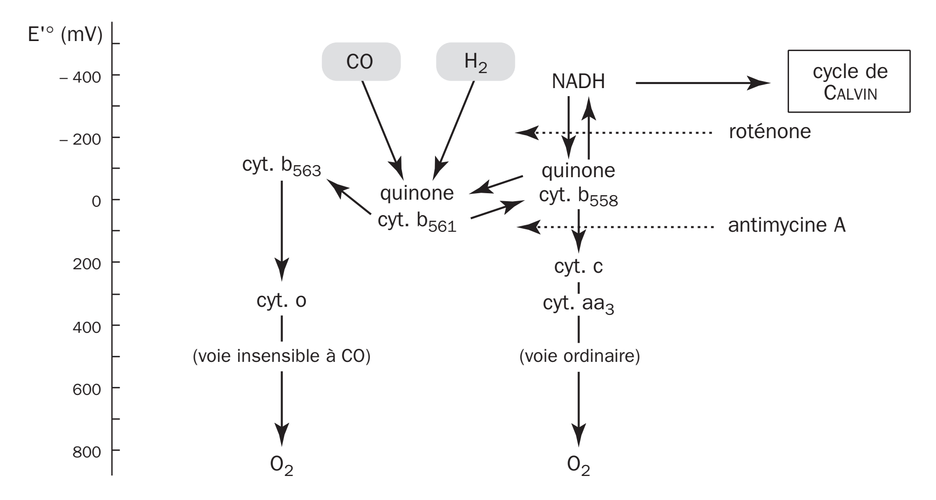
taxonomiques divers. Ce sont la plupart du temps des chimio-lithotrophes, l'énergie étant produite par l'oxydation de CO en CO_2. L'utilisation du second fait de ces bactéries des **autotrophes**. En somme, lorsqu'elles se développent sur CO, elles jouent sur deux tableaux : production d'énergie et fabrication du gaz carbonique comme source de carbone. En anaérobiose, le CO est utilisé par divers organismes méthanogènes, acétogènes, sulfato-réducteurs et phototrophes. Le mécanisme utilisé est très différent dans les deux cas. Chez les aérobies, le CO est oxydé par une CO déshydrogénase, qui est une flavoprotéine contenant du **molybdène**, du sélénium et des noyaux fer-soufre. La CO déshydrogénase des anaérobies est très différente. Elle contient du nickel et fonctionne comme acétyl-CoA synthase. C'est l'enzyme déjà rencontrée chez les acétogènes et les méthanogènes.

On s'attardera ici à l'**oxydation aérobie** du monoxyde de carbone. Le carboxydotrophe servant de modèle est *Oligotropha carboxydovorans*. L'oxydation suivante est catalysée par une molybdo-enzyme flavinique :

$$CO + H_2O \longrightarrow CO_2 + 2\,e^- + 2\,H^+$$

La déshydrogénase travaille en contact étroit avec la face interne de la membrane où le monoxyde de carbone est oxydé, contrairement au méthane qui l'était sur la face externe. Les protons sont expulsés vers l'extérieur, et l'énergie est donc en partie récupérée sous forme d'un potentiel de membrane. Il existe d'ailleurs une autre différence avec l'oxydation du méthane. La spécificité de la CO déshydrogénase est assez étroite pour n'accepter que CO. À défaut de la présence de monoxyde de carbone, les bactéries peuvent continuer à vivre comme des chimio-lithotrophes en oxydant de l'hydrogène par une hydrogénase. Le potentiel du couple CO_2/CO est très négatif , soit E'° = – 540 mV, plus bas que celui de l'hydrogène (– 414 mV). C'est pourquoi la réduction de CO_2 en CO des espèces anaérobies est une opération thermodynamiquement difficile exigeant une source d'électrons très réductrice. Inversement l'oxydation devrait pouvoir s'effectuer facilement avec des effecteurs variés, et comme le saut énergétique jusqu'à O_2 est important, le monoxyde de carbone apparaît comme un très bon carburant. Divers colorants font l'affaire comme accepteurs artificiels (bleu de méthylène, thionine, phénazine méthosulfate), alors que la déshydrogénase ne réduit pas les accepteurs à bas potentiel comme les viologènes. L'accepteur physiologique de la CO déshydrogénase de *O. carboxydovorans* est un cytochrome b_{561}, vers lequel convergeraient aussi les électrons en provenance de l'hydrogène. Comme la plupart des carboxydotrophes, cette espèce a deux voies respiratoires fonctionnant avec O_2, l'une étant résistante à l'inhibition par CO ou le cyanure (1 µM), l'autre étant de type standard avec un cytochrome c et un cytochrome c oxydase **[68]**. On sait que les bactéries ont couramment plusieurs chaînes respiratoires pour faire face à des conditions changeantes. Les bactéries ont la possibilité ici de vivre en hétérotrophie ou en autotrophie. Le premier cas est celui de la voie ordinaire où interviennent des déshydrogénases à $NAD^+/NADH$, des cytochromes b et c, une cytochrome c oxydase terminale de type aa_3. Cette voie est bloquée par la roténone et l'antimycine A. Le NADH est en même temps une source d'électrons pour l'assimilation de CO_2 en autotrophie. Une seconde voie est insensible au CO et au

cyanure. Son oxydase terminale est de type o et l'inhibiteur est le HQNO. Les deux voies sont indiquées par un plan.



Voies respiratoires de O. carboxydovorans

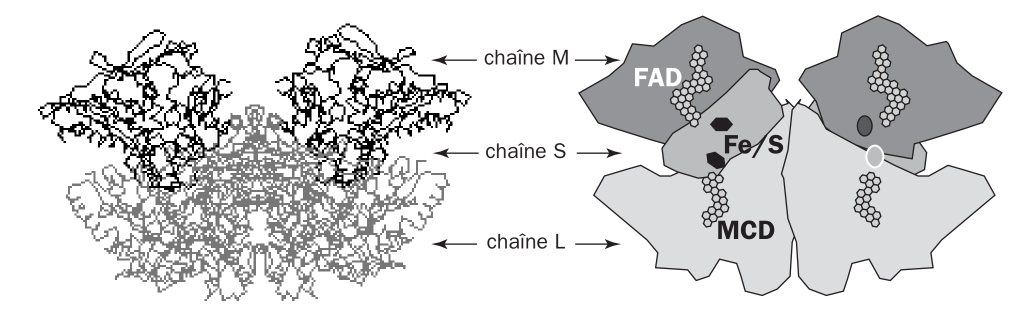
L'oxydation de CO ou de H_2 fait passer les électrons préférentiellement vers la voie insensible à CO, ce qui semble logique. Un caractère intéressant de cette physiologie est la possibilité d'engendrer le NADH nécessaire à la vie en autotrophie, puisque le cycle de CALVIN exige à la fois un réducteur et de l'ATP. Des expériences ont été faites pour déterminer comment les électrons parviennent au NAD^+ pour sa réduction en NADH **[69]**. On voit d'après le diagramme que les électrons produits par l'oxydation de CO ou de H_2 ne peuvent aboutir à NADH qu'en remontant l'échelle des potentiels vers les valeurs négatives. Le problème est le même que celui des phototrophes. Un **courant d'électrons inverse** actionné par le potentiel de membrane est à l'origine du NADH. Les faits expérimentaux militent en faveur de cette conclusion. Un apport soudain de CO et d'oxygène à des cellules de *O. carboxydovorans* déclenche une formation immédiate de NADH qui est inhibée par la roténone. Les agents découplants suppriment la réduction en NADH, ainsi que les inhibiteurs de l'ATPase, tandis que l'antimycine A n'a pas d'effet [11]. Aucune réduction directe de NAD^+ par le flux d'électrons en provenance de CO n'est observée, mais les intermédiaires obligés sont les cytochromes b_{561} et b_{558}. L'inhibition exercée par les agents découplants sur le courant d'électrons inverse montre bien que le potentiel de membrane est indispensable à l'opération.

Le courant d'électrons inverse n'est plus nécessaire au cours de la croissance hétérotrophe, par exemple sur pyruvate. Des mesures ont montré que le flot des électrons emprunte de préférence la voie respiratoire sensible à CO quand la croissance s'effectue sur $CO_2 + H_2$ ou sur pyruvate. Le rapport H^+/O, qui mesure la translocation de protons par atome d'oxygène, est de l'ordre de 6 dans les deux

11 - *Rappels : la roténone inhibe le complexe respiratoire de la NADH déshydrogénase, alors que l'antimycine A agit sur l'étape bc_1.*

cas. La croissance sur le seul CO est moins rapide avec un rapport H^+/O qui tombe à 4. Comme elle met à contribution la voie respiratoire insensible à CO, on peut supposer que celle-ci recharge également le potentiel de membrane, mais qu'elle le fait moins efficacement. On constate une fois de plus la multiplicité des circuits énergétiques chez les bactéries, leur offrant d'optimiser les oxydations, la production d'ATP et l'établissement du potentiel membranaire au gré des conditions.

Quelles sont les propriétés de la **CO déshydrogénase** des carboxydotrophes ? Chez *Oligotropha carboxydovorans*, l'enzyme a la structure $(LMS)_2$, donc un dimère de trimères. Les trois gènes correspondants, *cobx*, *cobs* et *col* sont groupés dans cet ordre sur un grand plasmide de 128 kb (pHCG3). Ils sont placés sur un segment de 30 kb près des gènes du cycle de CALVIN et de ceux de l'hydrogénase (*hox*). Un fort conservatisme de séquence a été trouvé avec d'autres espèces **[70]**. Après élimination du plasmide, *O. carboxydovorans* perd en même temps la capacité d'oxyder CO et H_2, et n'assimile plus CO_2. Les sous-unités L (88,7 kDa), M (30,2 kDa) et S (17,8 kDa) forment un complexe contenant une chaîne de transporteurs d'oxydoréduction. Sur la base des séquences, l'enzyme fait partie d'une famille d'hydroxylases à molybdène **[71]**.



CO déshydrogénase de O. carboxidovorans

L'attaque du substrat se fait dans les sous-unités M au niveau d'un cofacteur contenant le **molybdène** (molybdoptérine-cytosine dinucléotide ou MCD) de même nature que celui que nous retrouverons bientôt dans la réduction des nitrates. Les intermédiaires suivants sont deux noyaux [2Fe-2S] désignés comme I et II (ils sont dans des environnements différents). Enfin une flavine, qui est le FAD, reçoit les électrons avant de les expédier aux transporteurs respiratoires. Le dispositif n'est pas sans analogie avec celui d'une autre molybdo-enzyme classique, la xanthine oxydase. Une particularité importante ici est la présence du **sélénium** dans le site actif. Celui-ci se trouve enfoui assez profondément dans la sous-unité L en même temps que le cofacteur à molybdène. La position exacte de Se dans la protéine a été déterminée dans la structure obtenue par cristallographie **[72]**. Son rôle catalytique dans l'oxydation de CO semble essentiel. Le sélénium est porté sur le soufre d'un résidu de cystéine modifiée, la S-sélanylcystéine qu'il ne faut pas confondre avec la sélénocystéine, acide aminé où le sélénium remplace le soufre. Ici le sélénium est surajouté au soufre.

Mécanisme hypothétique de la CO déshydrogénase

Le mécanisme est encore hypothétique. Il ferait passer Mo(VI) penta-coordonné à Mo(IV) tétra-coordonné, avec participation du sélénium sous forme de sélénure de carbonyle SeCO. Nous retrouvons le sélénium dans une oxydoréduction concernant CO_2 ou un carbonyle. D'autres exemples sont cités en glossaire. Grâce à cette chimie particulière, le monoxyde de carbone produit en quantité par nos moteurs ne s'accumule pas sur la planète, et l'on ne peut que s'en réjouir !

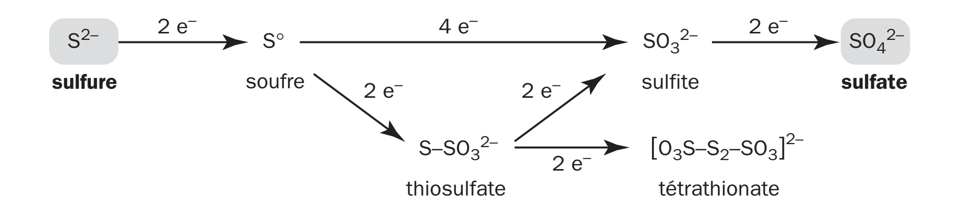
3.8 - DU SULFURE AU SULFATE

L'activité volcanique mondiale déverse sans cesse de grandes quantités de composés soufrés dans la biosphère, soit au cours des éruptions, soit par les fumerolles. Il y a dans le monde un peu plus d'une cinquantaine de volcans qui ont une ou plusieurs éruptions par an ou même par jour (Stromboli). La majeure partie du soufre émis est sous forme de dioxyde de soufre (SO_2), accompagné de H_2S, de soufre élémentaire [12], de sulfure de carbonyle (COS), de disulfure de carbone (CS_2) et de petites quantités de produits secondaires tels que AsS. L'estimation des quantités de SO_2 annuelles émises est très difficile mais serait au minimum de 9 à 11 millions de tonnes. Or l'activité industrielle humaine en répandrait bien davantage, de l'ordre de 80 millions de tonnes par an. Une partie se retrouve à l'état d'acide sulfurique et peut atteindre la haute atmosphère ou participer aux pluies acides.

Le soufre est présent dans les constituants de la vie à son niveau d'oxydoréduction le plus bas, qui est celui de l'ion sulfure (S^{2-}), de l'hydrosulfure (HS^-) et de l'hydrogène sulfuré (H_2S). Les sulfures sont également produits par l'activité des sulfato-réducteurs, et sont déversés en abondance par la décomposition de la matière vivante, animale ou végétale. Ils sont pris en charge par des bactéries qui les oxydent, soit en soufre élémentaire (S^0), soit en produits plus oxydés jusqu'à l'ion sulfate. Cette fonction est bénéfique pour l'environnement, car les composés réduits du soufre sont toxiques à faible dose pour les cellules vivantes, et leur accumulation finirait par dévaster toute la biosphère !

---

12 - Certains volcans émettent de la vapeur de S qui se condense en dépôts importants. Le Kawah Ijen, à l'Est de Java, présente une fontaine de soufre liquide émise à 225°C, se solidifiant en masses compactes qui sont exploitées. Le volcan porte à 2280 m d'altitude un vaste lac de cratère contenant de l'acide chlorhydrique et sulfurique à un pH de 0,3 ! Parmi d'autres volcans connus pour leur soufre est le Chicòn au Mexique.



Il faut un départ de 8 électrons pour passer du sulfure au sulfate, et ces oxydations se font le plus souvent en aérobiose, notamment par les bactéries du genre *Thiobacillus*. Les bactéries phototrophes opèrent un cheminement similaire en anaérobiose. Le passage inverse du sulfate au sulfure est pratiqué par les organismes sulfato-réducteurs anaérobies examinés dans un chapitre ultérieur. Ces conversions dans un sens ou dans l'autre fonctionnent dans le cycle naturel du soufre, où des étapes effectuées en présence d'oxygène alternent avec des phases réalisées en son absence, comme dans le cycle du carbone mettant en jeu le méthane et le gaz carbonique.

Le pouvoir d'oxyder le soufre et ses dérivés n'est pas l'apanage d'un groupe taxonomique particulier. On peut distinguer au moins trois ensembles de bactéries capables de pratiquer ces oxydations. Les phototrophes anaérobies forment un premier groupe. Ces bactéries pourpres ou vertes se servent de soufre réduit comme source d'électrons pour faire marcher leur photosynthèse, mais nous les laisserons de côté ici. Par contre les **chimio-autotrophes** (ou chimio-litho-autotrophes) sont parmi les plus importants. Ils assimilent le gaz carbonique en utilisant l'énergie de l'oxydation des sulfures, du soufre ou du thiosulfate par O_2. Le terme ultime de ces oxydations est généralement l'ion sulfate. Le genre *Thiobacillus* occupe une place éminente dans ce deuxième groupe de bactéries. Un troisième groupe rassemble les **chimio-hétérotrophes** qui pratiquent les mêmes oxydations, mais ont besoin d'une source de carbone organique.

Le genre *Thiobacillus* renferme toute une gamme d'espèces exclusivement autotrophes, mais qui se distinguent par leurs caractères physiologiques. *Thiobacillus thioparus*, *T. neapolitanus* et *T. denitrificans* se développent de préférence à un pH proche de la neutralité. Le dernier a en outre la faculté de réduire le nitrate en nitrite et N_2, processus appelé dénitrification et fonctionnant en absence d'O_2. C'est, en somme, une espèce pouvant passer de la respiration classique sur O_2 à une respiration anaérobie sur nitrate, le substrat oxydé étant du sulfure, du soufre, du thiosulfate… Ces germes remarquables sont en même temps des autotrophes. Cette propriété, qui consiste à assimiler CO_2 par le cycle de CALVIN, s'accompagne d'inclusions caractéristiques appelées ***carboxysomes****. Une autre série du genre *Thiobacillus* rassemble des espèces se développant à pH acide (optimum de 2 à 4 : *T. acidophilus*, *T. thiooxidans*, *T. ferrooxidans*) ou même très acide (jusqu'à 1, *T. prosperus*). *T. ferrooxidans* peut se développer en tirant son énergie de l'oxydation du fer ferreux.

Parmi les chimio-hétérotrophes figurent des espèces très différentes par leurs caractères morphologiques et physiologiques. Ces bactéries généralement aquatiques sont moins acidophiles que les précédentes. Les *Beggiatoa* et *Cytophaga*

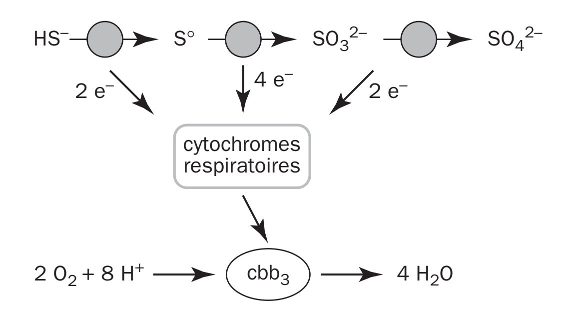
sont mobiles par glissement. Les premiers se développent dans les eaux sulfureuses, les eaux douces avec des plantes en décomposition, les rizières et les sédiments marins. Les *Cytophaga* sont importants dans l'épuration des eaux usées, attaquent la cellulose, la chitine et autres polymères, corrodent le bois. Les bactéries du genre *Thiothrix* forment des colonies de filaments. La physiologie de ces espèces est imparfaitement connue et présente de grandes variations en fonction des conditions, mais ce sont des espèces "tout-terrain". Celles qui attaquent les sulfures accumulent des granules de soufre intracellulaires qui leur servent de réserve de substance à oxyder en fonction d'un changement du milieu. Cette propriété adaptative est commune dans le genre *Thiobacillus*.

La diversité des aptitudes physiologiques règle la répartition des espèces dans le temps et dans l'espace. Elles se succèdent en fonction de l'épuisement du substrat, de l'acidité du milieu liée à la production de H_2SO_4, des changements de température, de l'évaporation... Il en résulte une certaine stratification des espèces dans les sédiments et dans le sol. Dans les conditions physiologiques habituelles, le sulfure est surtout présent comme hydrosulfure (HS^-), le sulfite comme hydrosulfite (HSO_3^-). Voici un tableau donnant les potentiels redox des différents couples à l'état standard et à pH neutre **[73]** :

Couple	*Forme physiologique*	*E'° (mV)*
Sulfate/Hydrosulfite	SO_4^{2-}/HSO_3^-	– 516
Thiosulfate/Hydrosulfure + Hydrosulfite	$S_2O_3^{2-}/HS^- + HSO_3^-$	– 402
Soufre élémentaire/Persulfure d'hydrogène	$2\ S^0/H_2S_2$	– 340
Soufre élémentaire/Hydrosulfure	S^0/HS^-	– 270
Persulfure d'hydrogène/sulfure d'hydrogène	$H_2S_2/2\ H_2S$	– 200
Hydrosulfite/Hydrosulfure	HSO_3^-/HS^-	– 116
Hydrosulfite/Soufre élémentaire	HSO_3^-/S^0	– 38
Tétrathionate/Thiosulfate	$S_4O_6^{2-}/S_2O_3^{2-}$	+ 24

Ces potentiels standards sont à comparer avec celui du couple formé par l'oxygène et l'eau (+ 820 mV), mais ils ne sont que des points de repère, puisque les valeurs réelles dépendent du rapport entre formes oxydée et réduite, et sont généralement très différentes ! Du sulfure ou de l'hydrosulfure au sulfate, il y a donc deux sauts énergétiques majeurs, le plus important étant celui de l'oxydation de l'hydrosulfite au sulfate puisque le potentiel du couple correspondant est très bas, soit – 516 mV.

Les électrons sont canalisés jusqu'à O_2 par la chaîne respiratoire qui comporte ici une quinone et au moins un cytochrome c. La réduction de l'oxygène se fait par une cytochrome c oxydase cbb_3, l'homologue du cytochrome aa_3 des mitochondries **[74]**. Les oxydases terminales de ce type sont des pompes à protons, et aident à l'établissement du potentiel membranaire (Δp) **[75]**.



Parmi les interconversions entre produits soufrés se placent des intermédiaires qui sont des oxydes complexes du type thiosulfate, trithionate, tétrathionate et polythionates. Ces produits sont placés comme des voies de garage ou des variantes sur le chemin qui va du sulfure au sulfate. Certaines sont des oxydoréductions, d'autres des hydrolyses. Près de la moitié des espèces bactériennes vivant de l'oxydation des sulfures et du soufre peuvent se développer sur tétrathionate, un substrat d'emploi commode au laboratoire. L'interconversion entre thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) et tétrathionate ($S_4O_6^{2-}$) se fait par la **thiosulfate déshydrogénase** périplasmique utilisant le cytochrome c comme donneur ou accepteur chez *Thiobacillus* W5 **[76]**, selon :

$$2\ S_2O_3^{2-} + 2\ \text{cytochrome c}\ (Fe^{3+}) \Leftrightarrow S_4O_6^{2-} + 2\ \text{cytochrome c}\ (Fe^{2+}) \qquad (1)$$

Chez *Thiobacillus acidophilus*, des hydrolases permettent de métaboliser le tétrathionate et le trithionate selon les modèles suivants **[77]** :

Pour le tétrathionate : $S_4O_6^{2-} + H_2O \longrightarrow S_2O_3^{2-} + S^0 + SO_4^{2-} + 2\ H^+ \qquad (2)$

Pour le trithionate : $S_3O_6^{2-} + H_2O \longrightarrow S_2O_3^{2-} + SO_4^{2-} + 2\ H^+ \qquad (3)$

Les bactéries responsables sont tenues de s'adapter à des conditions très changeantes et modifient leurs propriétés en conséquence. L'élimination rapide des sulfures excédentaires est un facteur essentiel dans l'environnement. Les sulfures sont toxiques pour de nombreux micro-organismes, et leur accumulation dans les sédiments freine les biodégradations. En les oxydant très activement, un *Thiobacillus* peut engorger son métabolisme respiratoire et y fait face en stockant provisoirement du soufre élémentaire **[78]** ou en dirigeant une partie du soufre vers le thiosulfate et le tétrathionate, qui jouent en quelque sorte le rôle de réservoir tampon. Cette activité bactérienne est un facteur important d'acidification du milieu. Elle entraîne des phénomènes de corrosion dans les canalisations et distributions industrielles partout où il y a apport de soufre ou de sulfures.

Thiobacillus caldus se développe en culture à 45°C et à pH très acide (2,5), sur tétrathionate 5 mM comme source d'énergie. La source carbonée est apportée par barbotage d'air enrichi en gaz carbonique **[79]**. L'oxydation des composés soufrés en sulfate est réalisée en grande partie ou en totalité par des enzymes cytoplasmiques, à l'exception du passage thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) vers le tétrathionate ($S_4O_6^{2-}$) qui a lieu dans le périplasme. Comme le milieu extérieur est très acide relativement au cytoplasme, les cellules doivent pomper les substrats soufrés vers l'intérieur et y consacrer de l'énergie. Des différences importantes de localisation

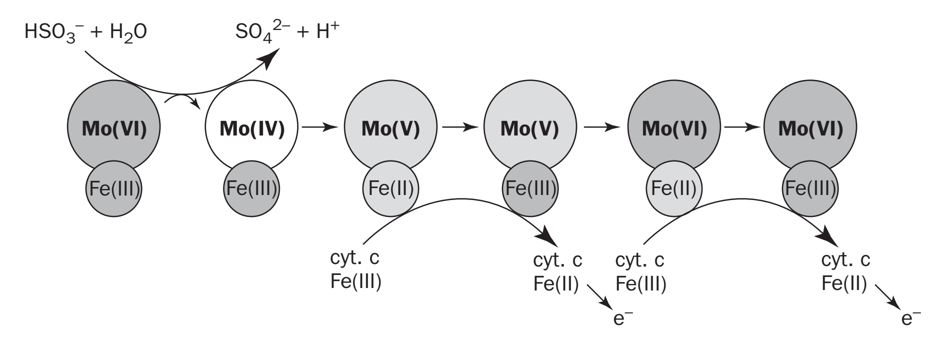
et de fonctionnement des enzymes semblent exister d'une espèce à l'autre et la question devient vite ardue.

L'oxydation du sulfure ou de l'hydrosulfure en S^0 se fait typiquement par un **flavocytochrome**, constitué de deux sous-unités inégales contenant le FAD et l'hème C. La sulfure déshydrogénase chez *Thiobacillus* W5 fonctionne à un pH optimum de 8,6 alors que le pH extérieur est acide **[80]** ! L'archétype de ces flavocytochromes fut à l'origine celui de *Chromatium vinosum*, un phototrophe anaérobie qui utilise préférentiellement le sulfure comme source d'électrons pour faire marcher sa photosynthèse. L'enzyme de *Pyrococcus furiosus*, un hyperthermophile, contient 2 FAD et plusieurs noyaux fer-soufre de nature différente **[81]**. D'autres espèces oxydent le sulfure sans se servir d'un flavocytochrome. Cependant la plupart des formes qui se développent sur thiosulfate en possèdent un qui pourrait avoir d'autres fonctions selon une hypothèse avancée par FRIEDRICH **[82]**.

L'oxydation du sulfite (ou d'hydrosulfite) en sulfate se fait par deux méthodes. La première est une oxydation directe catalysée par la **sulfite oxydase**, ou sulfite : cytochrome c oxydoréductase (EC 1.8.2.1), ou encore SOR. La seconde se fait en deux étapes par l'**APS réductase** (1.8.99.2) suivie de l'ADP sulfurylase. Ces terminologies un peu compliquées cachent des opérations simples. La première (l'oxydation directe) est la plus répandue et correspond à la réaction :

$$HSO_3^- + 1/2\ O_2 \longrightarrow SO_4^{2-} + H^+ \qquad (4)$$

L'enzyme est périplasmique. Elle n'est pas propre aux bactéries. Elle figure dans l'espace inter-membranaire des mitochondries animales où elle a été très étudiée. On continue à l'appeler sulfite oxydase bien que le véritable accepteur dans tous les cas examinés ne soit pas l'oxygène mais un cytochrome c (l'oxygène n'intervient donc qu'en aval). L'enzyme contient du **molybdène** au sein d'une molybdoptérine (MPT), et fait donc partie de la famille des molybdo-enzymes. Le molybdène passe par plusieurs niveaux d'oxydoréduction, Mo(IV), Mo(V) et Mo(VI), identifiables en RPE. La sulfite oxydase a été purifiée récemment à partir de *Thiobacillus novellus* cultivé à pH 8,5 sur carbonate de sodium et thiosulfate **[83]**. L'enzyme possède deux sous-unités inégales de 40 et 8 kDa. La première renferme la molybdoptérine, la seconde est un cytochrome c_{552}. L'ensemble fonctionne comme une seule et même molécule pouvant stocker 3 électrons, deux sur le métal, un seul sur le cytochrome.



Oxydation du sulfite

L'oxydation d'une molécule de sulfite n'apporte que 2 électrons, déchargés un par un à la sortie comme l'indique le dessin. Un cytochrome c_{550} indépendant du précédent est l'accepteur, et se réoxyde sur la chaîne respiratoire.

Observons un petit détail significatif : l'oxydation de l'hydrosulfite, qui est protoné à Ph neutre, libère un proton avec le sulfate dans le périplasme, opération qui facilite l'acidification de la surface externe de la membrane cytoplasmique et contribue à son potentiel électrochimique.

La deuxième méthode d'oxydation du sulfite passe par l'APS avec conservation de l'énergie sous forme d'ADP ou d'ATP. Elle se fait en deux étapes.

APS
adénosine-5'-phosphosulfate

APS réductase
$HSO_3^- + AMP \longrightarrow APS + 2e^-$

ADP sulfurylase
$APS + phosphate \longrightarrow ADP + SO_4^{2-}$

La première est une oxydation par l'**APS réductase** (EC 1.8.99.2), mieux connue chez les bactéries assimilatrices du sulfate (qui font la réaction inverse). L'examen des séquences laisse supposer que la réductase conserve des similitudes chez toutes les bactéries qui catalysent une oxydoréduction entre sulfate et APS, que ce soit dans un sens ou dans l'autre **[84]**. La structure est celle d'un hétérodimère comportant une flavine (FAD) et deux noyaux [4Fe-4S]. Quand la biosphère s'est enrichie en O_2 dans un passé lointain, les aérobies auraient récupéré un modèle ancien déjà en service chez les anaérobies. L'énorme accumulation du sulfate dans l'eau de mer, où il atteint une concentration de 28 mM, a été favorisée au cours de l'histoire de la terre par l'activité des organismes photosynthétiques utilisant les sulfures comme sources d'électrons. Les oxydations aérobies évoquées ici seraient donc apparues ultérieurement. La deuxième conversion est catalysée par l'**ADP sulfurylase** (EC 2.7.7.4), elle libère le sulfate et de l'énergie sous forme d'ADP (par sa liaison pyrophosphate à haut potentiel). La réaction correspond en somme à la mobilisation de l'énergie produite au cours de la formation de l'APS. Deux molécules d'ADP (des sous-ATP !) sont facilement traitées par une réaction classique dite de l'adénylate kinase ou myokinase : 2 ADP ↔ ATP + AMP. Un mécanisme analogue se retrouvera chez les sulfato-réducteurs mais fonctionnera en sens inverse. L'ADP sulfurylase de *Thiobacillus denitrificans* a été étudiée en détail.

E + AMP-S (= APS) ⇌ E–AMP-S → E–AMP (→ SO_4^{2-}) → E–ADP (← phosphate) ⇌ E + ADP

"ADP sulfurylase"

Son fonctionnement comporte la formation d'une liaison covalente transitoire entre l'enzyme (E) et l'APS **[85]**.

Différents arguments tirés de l'emploi des inhibiteurs comme l'arséniate montrent que les étapes désignées par les flèches noires sont irréversibles. L'enzyme ne peut donc pas revenir en arrière et faire de l'APS avec du sulfate et de l'ADP. Le schéma ci-dessus reste pourtant valable en remplaçant le phosphate par du pyrophosphate et le produit de la réaction est alors l'ATP ! C'est pourquoi BRÜSER et coll. ont proposé d'appeler cette enzyme, non pas ADP sulfurylase, mais ATP sulfurylase. Ce n'est pas une simple subtilité de nomenclature, parce que la sulfurylase ressemble à d'autres enzymes qui fonctionnent aussi avec l'ATP ou un triphosphate, et il est possible et même probable que ce soit la véritable réaction physiologique. L'enzyme est inhibée expérimentalement par le molybdate (Mo_4^{2-}) qui intervient comme analogue du sulfate. C'est un inhibiteur caractéristique de cette étape du cycle du soufre. Il agit aussi bien chez *Thiobacillus* et les phototrophes, qui oxydent le soufre, que chez les sulfato-réducteurs opérant en sens inverse. La récupération de l'énergie ATP par l'intermédiaire de l'APS apporte donc aux bactéries un bénéfice essentiel au cours de l'oxydation du sulfite en sulfate.

En résumé l'oxydation du sulfite en sulfate est productrice d'énergie de deux façons différentes. La première utilise la sulfite oxydase et repose sur une translocation de protons contribuant à la formation d'un potentiel membranaire. La seconde privilégie l'apparition d'ADP ou d'ATP, et se fait en deux étapes, celles de l'APS réductase et de l'ADP(ATP) sulfurylase.

3.9 - ÉLIMINATION DE COMPOSÉS SOUFRÉS SIMPLES

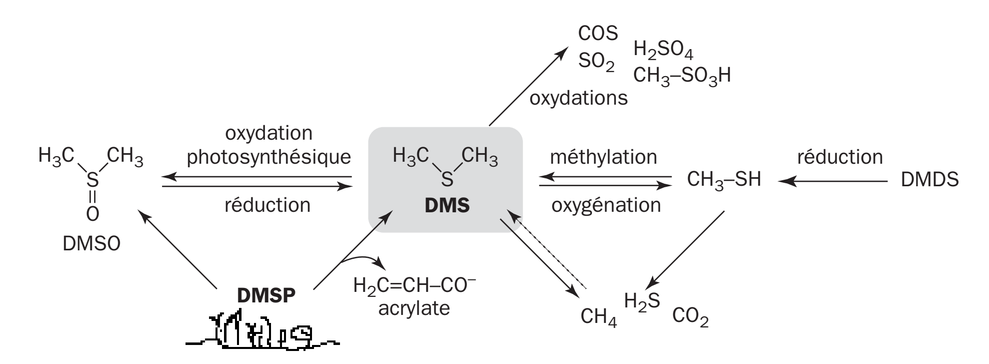
Il y a d'énormes quantités de produits soufrés dans l'atmosphère, mais pour une fois l'homme n'est pas le principal responsable de cette pollution. Il s'agit pour près de la moitié du diméthyl-sulfure (DMS), accompagné de H_2S, de sulfure de méthyle (ou méthanethiol) et du diméthyl-disulfure (DMDS). Ces produits tirent leur origine de deux sources principales, la méthionine (l'acide aminé entrant dans la composition des protéines) et le diméthylsulfonium-propionate ou DMSP.

L'environnement renferme également une foule de composés secondaires, comme le thiocyanate ($S{=}C{=}N^-$), les isothiocyanates ($R{-}N{=}C{=}S$), et des glucosinolates formés par les plantes.

$H_3C{-}SH$	$H_3C{-}S{-}CH_3$	$H_3C{-}S{-}S{-}CH_3$	$(H_3C)_2S^+{-}(CH_2)_2{-}COO^-$
Méthanethiol	*DMS*	*DMDS*	*DMSP*

Le **DMSP** est produit par le phytoplancton marin, les algues de la zone des marées et les graminées littorales du genre *Spartina*. Ce produit agirait comme régulateur physiologique de la pression osmotique en milieu salin et comme cryoprotecteur

quand l'azote est limitant. Il aurait aussi le rôle d'un agent anti-oxydant **[86]** ou de défense contre les prédateurs (crustacés, protozoaires). Le précurseur du DMSP chez l'algue verte *Enteromorpha intestinalis* est la méthionine **[87]**. L'attaque prépondérante du DMSP se fait par une lyase qui libère de l'acrylate et du diméthylsulfure (DMS). L'oxydation du DMSP produit aussi du diméthylsulfoxyde (DMSO).



Les voies du diméthyl-sulfure

Le petit tableau montre quelques conversions du **diméthyl-sulfure** (DMS). Le DMSP est la source principale de DMS, qui naît également de la réduction du DMSO par des sulfato-réducteurs. La quantité de DMS émise annuellement dans l'atmosphère est estimée à 45 millions de tonnes de soufre **[88]**. La concentration en DMSP et DMS peut atteindre 1 µM et davantage dans les tapis de cyanobactéries et les marais salés. Ils sont abondants dans les coraux, les algues, les diatomées et certaines plantes. La surface de la mer, là où elle est riche en phytoplancton, est saturée en DMS car celui-ci est très peu soluble et volatil comme l'éther (il bout à 36°C). Sa présence confère à l'eau de mer une odeur perceptible et son origine est surtout biologique. Par oxydation photochimique dans l'atmosphère, il engendre du sulfure de carbonyle, du dioxyde de soufre, de l'acide sulfurique et de l'acide méthane-sulfonique, ainsi que des produits mineurs. Toute augmentation des produits oxydés du soufre comme l'acide sulfurique, soit à la suite d'une pollution d'origine humaine, soit au cours d'éruptions volcaniques, est responsable de pluies acides. L'introduction d'aérosols d'acide sulfurique dans la haute atmosphère a aussi pour conséquence d'intercepter une part de rayonnement solaire et d'avoir des répercussions climatiques, car il se forme des noyaux de condensation à l'origine d'une nébulosité. L'équilibre radiatif général de la biosphère est donc concerné. L'émission de DMS et la production d'acide sulfurique suggère une relation inattendue entre l'activité du plancton océanique et le climat !

Le *Thiobacillus thioparus* et bactéries de la même série sont capables d'oxyder divers substrats soufrés, DMS, DMDS, méthanethiol, en tirant leur énergie à la fois de l'oxydation de la partie carbonée et de celle de la partie soufrée **[89]**. Il y a plusieurs voies d'oxydation par O_2. La première, qui est l'oxydation en diméthylsulfoxyde (DMSO) est intéressante sur le plan biologique, car le DMSO est un accepteur d'électrons dans des respirations dites anaérobies, où l'oxygène est remplacé par le nitrate, le sulfate et d'autres composés. L 'oxydation du DMS en DMSO

est pratiquée aussi en anaérobiose par les bactéries phototrophes non oxygéniques qui s'en servent comme source d'électrons. La deuxième voie d'oxydation utilise successivement la diméthyl-sulfure mono-oxygénase et la méthanethiol oxydase. Ces enzymes catalysent respectivement les réactions :

Diméthyl-sulfure + O_2 + NADH $\longrightarrow$ méthanethiol + formaldéhyde + NAD^+ + OH^- (1)

Méthanethiol + O_2 + H_2O $\longrightarrow$ H_2S + formaldéhyde + H_2O_2 (2)

Ces réactions ont été observées chez les bactéries appartenant aux genres *Thiobacillus* et *Hyphomicrobium* **[90]**. Le formaldéhyde est pris en charge par le métabolisme monocarboné utilisant le *FH4**, et l'eau oxygénée est détruite par la catalase. Une variante de la réaction (2) repose sur une méthyltransférase et la formation de méthyl-FH4. Ces oxydations biologiques du DMS sont complétées par l'action photochimique faisant naître dans l'atmosphère un produit stable, l'acide méthanesulfonique (CH_3–SO_3H), qui est entraîné par la pluie et la neige ou qui se dépose avec la poussière. Des bactéries méthylotrophes spécialisées peuvent le récupérer comme source de carbone et d'énergie à l'aide d'une méthanesulfonate mono-oxygénase **[91]**. Le DMS est également métabolisé en H_2S par anaérobiose, et les méthanogènes le transforment en méthane. Le sulfure d'hydrogène est à nouveau méthylable en DMS, et il existe donc un cycle faisant alterner le DMS, le méthanethiol et le H_2S. Nous le retrouverons au Chapitre 7.

Et l'activité humaine là-dedans ? La contamination biologique de l'atmosphère en disulfure de carbone (CS_2) par le sol et les plantes a été estimée à 5 millions de tonnes de soufre, et l'activité industrielle, principalement la fabrication de viscose et de cellophane, introduirait un million de tonnes supplémentaires. La plus grande partie de la pollution soufrée vient du raffinage du pétrole, de la combustion des carburants utilisés pour le transport (malgré les progrès réalisés pour désulfurer l'essence et le gazole), de l'industrie minière et métallurgique et des appareils de chauffage. Cette pollution est surtout sous forme de SO_2 et contribue à l'apparition du *smog* au-dessus des grandes métropoles humaines (Los Angeles, Pekin, Mexico...)

En résumé, on a pu constater que le cycle du soufre a des ramifications complexes dans la biosphère. Nous n'avons abordé ici que la partie des oxydations. Les plus importantes traitent des produits simples comme l'hydrosulfure et accumulent des ions sulfate ou de l'acide sulfurique. Le diméthyl-sulfure est pour l'essentiel d'origine biologique et donne lieu à un chassé-croisé de réactions d'une variété surprenante. Les organismes responsables n'ont pas tous été répertoriés et il reste beaucoup à découvrir sur la variété des enzymes impliquées.

3.10 - L'OXYDATION DU FER ET DU MANGANÈSE

De nombreuses espèces bactériennes tirent leur énergie de l'oxydation à l'air du fer et du manganèse. Les "bactéries du fer" oxydent le fer ferreux en fer ferrique.

Certaines espèces oxydent aussi les sulfures et le soufre. Les réactions sont représentées par :

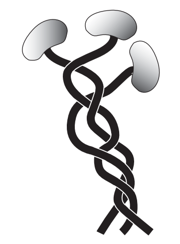
$$4\ Fe^{2+} + O_2 + 4\ H^+ \longrightarrow 4\ Fe^{3+} + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$S^{2-} + 2\ O_2 \longrightarrow SO_4^{2-} \quad (2)$$

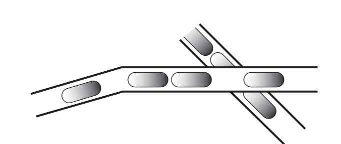
$$2\ S^0 + 3\ O_2 + 2\ H_2O \longrightarrow 2\ SO_4^{2-} + 4\ H^+ \quad (3)$$

Parmi celles-ci, *Gallionella ferruginea* et *Leptothrix ochracea* sont des habitants communs des sources ferrugineuses et font d'importants dépôts d'hydroxyde de fer grâce à la réaction (1).

Les *Gallionella* ont une morphologie curieuse : leurs cellules en forme de haricot excrètent une matrice organique dans laquelle les hydroxydes de fer précipitent, formant des filaments torsadés de 50 nm de diamètre. Les *Leptothrix* et *Sphaerotilus* s'entourent de gaines tubulaires dans lesquelles s'accumulent des oxydes de fer et de manganèse. Les sources thermales renferment des espèces voisines.



Gallionella ferruginea



Sphaerotilus

Ces organismes sont souvent adaptés à des eaux très pauvres en éléments nutritifs. Les *Gallionella* ont une Rubisco indicatrice d'un cycle de CALVIN assurant l'autotrophie. Ils sont en fait mixotrophes, car ils peuvent se fournir à la fois en CO_2 et en sources carbonées organiques (glucose, fructose, saccharose). Ce sont des espèces difficiles à cultiver. En culture aérée contenant du sulfure, les bactéries peuvent tirer tout leur carbone de CO_2. Les premières cultures de *G. ferruginea* ont été obtenues à 20-25°C par une technique dite de KUCERA et WOLFE **[92]**. Leur développement est très lent au-dessous de 12° et leur croissance est arrêtée au-dessus de 30° (comme il arrive souvent pour les bactéries du sol). Ces bactéries sont micro-aérophiles et croissent à un pH optimum de 6,5. Contrairement à *Gallionella*, les *Leptothrix* et *Sphaerotilus* n'assimilent pas CO_2 et vivent en stricte hétérotrophie.

Nous savons que les bactéries du genre *Thiobacillus* ont une importance économique considérable, car elles interviennent dans la désulfuration des rejets et des hydrocarbures, ainsi que dans les opérations minières. La vedette revient à *Thiobacillus ferrooxidans*. Cette espèce fortement acidophile est autotrophe et peut vivre dans des conditions extrêmes, soit à pH 2-3 et en présence de concentrations métalliques très fortes. Sa tolérance pour le cadmium, le zinc et le cuivre atteint des concentrations proches de la molarité. Elle résiste au cobalt (0,15 M), au chrome (75 mM), au plomb (1mM) et aux sels mercuriques (10 µM). Elle résiste

aussi à un niveau élevé d'ions sulfate (0,15 M). Ce germe extraordinaire assimile donc CO_2 et tire son énergie de l'oxydation du fer et des sulfures par le dioxygène à l'aide des réactions (2) et (3).

Le fer sous forme ferrique se comporte lui-même comme oxydant du sulfure et de quelques oxydes métalliques. Le sulfure de fer le plus abondant dans la nature étant la pyrite (FeS_2), la réaction théorique peut s'écrire :

$$14\ Fe^{3+} + FeS_2 + 8\ H_2O \longrightarrow 15\ Fe^{2+} + 2\ SO_4^{2-} + 16\ H^+ \qquad (4)$$

L'oxydation du fer de la pyrite libère sur ce principe donc de grandes quantités d'acide à raison de 16 protons par mole. La teneur élevée de la pyrite en soufre fait qu'elle n'est pas un bon minerai de fer. La pyrite cède généralement la place à d'autres formes minéralogiques (voir *Fer**). En principe, l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique correspond à un potentiel redox standard à Ph 7 de + 770 mV. Cette valeur élevée est proche de celle du couple O_2/H_2O (+ 820 mV), laissant supposer que le saut énergétique utilisable par *Thiobacillus* pour sa croissance sur le fer est faible. Cependant l'ion Fe^{3+} forme des hydroxydes insolubles par réaction sur l'eau : $Fe(OH)_2^+$, $Fe(OH)_3$, ou $Fe(OH)_4^-$. Cette propriété et l'apport d'acide déplacent l'équilibre d'oxydoréduction correspondant à la réaction (1) vers la droite, favorisent l'oxydation du fer ferreux et abaissant le potentiel correspondant. Donc en l'absence de sulfure à oxyder, la réaction (1) est plus à même de fournir l'énergie aux bactéries, en particulier si le milieu s'acidifie.

La présence de pyrite ou de sulfure produit énormément d'acide (réaction 2). La chute du pH à des valeurs proches de 2 ou au-dessous dissocie en partie les hydroxydes de fer, mais favorise la réaction (4) vers la droite, produisant davantage d'acidité et régénérant également du fer ferreux disponible pour la réaction (1). Il y a donc un cycle d'une partie du fer entre les deux réactions (1) et (4). En les combinant ainsi (par multiplication des coefficients) :

$$28\ Fe^{2+} + 7\ O_2 + 28\ H^+ \longrightarrow 28\ Fe^{3+} + 14\ H_2O \qquad (1')$$

$$28\ Fe^{3+} + 2\ FeS_2 + 16\ H_2O \longrightarrow 30\ Fe^{2+} + 4\ SO_4^{2-} + 32\ H^+ \qquad (4')$$

Le bilan résultant est :

$$2\ FeS_2 + 7\ O_2 + 2\ H_2O \longrightarrow 2\ Fe^{2+} + 4\ SO_4^{2-} + 4\ H^+ \qquad (5)$$

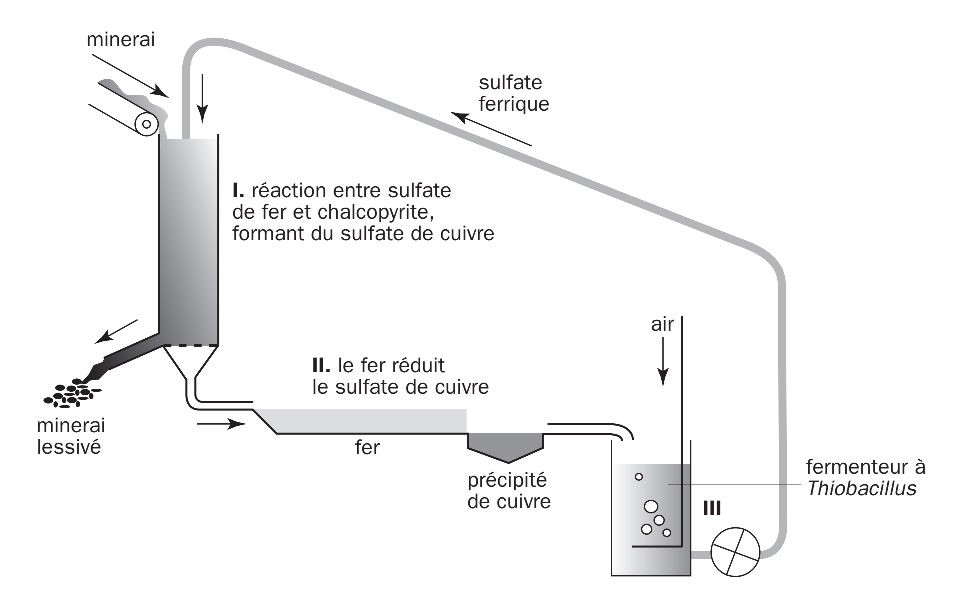
La réaction (5) nous éclaire sur l'activité de *Thiobacillus ferrooxidans* comme espèce minière. Le pH acide lui permet d'amorcer une oxydation du fer. Celui-ci va lui servir à mobiliser la pyrite, avec production d'acide sulfurique et de fer ferreux, entraînés l'un et l'autre par lessivage. En fait la bactérie utilise ici surtout l'énergie de l'oxydation à l'air du sulfure, une source d'énergie relativement confortable ! Comme l'ion ferreux est facilement réoxydé par les bactéries ou même spontanément par O_2, il y aura toujours assez de fer pour réamorcer l'oxydation de la pyrite en cas de besoin. Une partie du fer ainsi mobilisé tend à former des oxydes et hydroxydes insolubles dès que l'acide est éliminé, et il en résulte des dépôts ferrugineux importants appelés jarosite, alors que l'acide formé rend corrosives et polluantes les eaux de lessivage.

Sur le plan enzymatique, on dispose de quelques renseignements sur la S-Fe(III) oxydoréductase de *T. ferrooxidans*. L'enzyme a été purifiée **[93]** et paraît attachée à la membrane du côté du périplasme. Les renseignements sur son fonctionnement restent très fragmentaires.

Les ions ferriques sont capables d'oxyder divers ions et oxydes métalliques. Par exemple l'oxyde d'uranium(IV) de l'uraninite ou pechblende (UO_2) est solubilisé en uranium(VI) :

$$UO_2 + 2\,Fe^{3+} \longrightarrow UO_2^{2+} + 2\,Fe^{2+} \quad (6)$$

Les bactéries réoxydent le fer par un va-et-vient qui favorise ainsi la solubilisation de l'oxyde d'uranium. Le même principe peut être appliqué à d'autres minerais, grâce à l'alternance entre l'état oxydé et l'état réduit du fer et à l'entraînement des métaux par l'acide formé. Ces réactions ont conduit au développement de ce qu'on appelle la **biolixiviation**. Avec *Thiobacillus* et bactéries apparentées, il est ainsi possible de récupérer du cuivre à partir de minerais à faible teneur ou de déchets miniers. Le cuivre est tiré de plusieurs minéraux dont la chalcopyrite ($CuFeS_2$) et la chalcosine (Cu_2S). Un procédé du même type a été utilisé pour l'extraction d'autres métaux comme l'or. Voici un schéma de principe de l'extraction du cuivre par lixiviation [13] :



L'opération représentée comporte trois phases. En (**I**), la chalchopyrite est traitée en présence de sulfate ferrique, qui est réduit en sulfate ferreux avec solubilisation du cuivre en sulfate :

$$2\,Fe_2(SO_4)_3 + CuFeS_2 + 2\,H_2O + 3\,O_2 \longrightarrow CuSO_4 + 5\,FeSO_4 + 2\,H_2SO_4 \quad (7)$$

---

13 - Schéma imité de Microbiologie par PRESCOTT, HARLEY et KLEIN (DEBOECK)

En (**II**), le mélange acide soluble, contenant $CuSO_4$ et $FeSO_4$, est passé sur un lit de fer métallique qui procède à la réduction du sulfate de cuivre et à la précipitation du métal :

$$CuSO_4 + Fe \longrightarrow FeSO_4 + Cu \quad (8)$$

En (**III**), les bactéries sont à l'œuvre dans un fermenteur contenant un milieu nutritif acide et aéré, alimenté par le sulfate de fer. Celui-ci est oxydé en $Fe_2(SO_4)_3$ par les bactéries. Il est récupéré et recyclé. Le pilotage de ce type d'extraction reste délicat dans la pratique en fonction de la nature du minerai. *Thiobacillus* commence généralement par oxyder préférentiellement le sulfure avant le fer, ce qui retarde la biolixivation. Des auteurs japonais ont préconisé un procédé par flottation où les bactéries qui adhèrent aux particules de pyrite à l'état divisé tendent à couler au fond de la suspension et facilitent l'élimination des impuretés par flottation **[94]**.

Et le **manganèse** ? Cet élément est abondant et se rencontre principalement à l'état de Mn(II) soluble ou de formes oxydées insolubles Mn(II) et Mn(III). Le dioxyde de manganèse MnO_2 est un solide brun et la forme la plus stable dans l'environnement. Le cycle d'oxydoréduction du manganèse dans la nature est en partie parallèle à celui du fer. Nous en aurons une indication dans un chapitre ultérieur, où les deux métaux apparaîtront comme des accepteurs respiratoires. Une particularité des oxydes de manganèse est leur pouvoir oxydant sur divers éléments minéraux et organiques. En outre MnO_2 peut véhiculer d'autres métaux : Cd, Cu, Co, Zn. Le Mn(II) engendré par réduction est réoxydé par de nombreuses espèces bactériennes, par exemple par les *Leptothrix* déjà mentionnés. *L. discophora* se caractérise par la double précipitation d'oxyde de Fe et de Mn dans la gaine qui l'entoure. Le manganèse s'oxyde de deux façons dans la nature, soit par une réaction spontanée accélérée en milieu alcalin, soit par action enzymatique. La précipitation des oxydes par *Leptothrix* résulte de l'action d'une protéine de 110 kDa excrétée par les cellules. Cette enzyme a été caractérisée dès 1987 et présente des similitudes avec les oxydases renfermant plusieurs ions cuivre **[95]**. L'oxydation du manganèse paraît généralement réalisée par une cuproprotéine, étudiée chez *Pseudomonas putida*, une espèce commune qui a l'avantage d'être plus facile à manipuler expérimentalement. Chose curieuse, certains *Bacillus* marins font des spores qui oxydent les ions Mn^{2+} et s'entourent d'un précipité de dioxyde, mais l'isolement de l'enzyme à partir des spores s'est avéré difficile. L'oxydation du manganèse paraît jusqu'à présent toujours sous la dépendance d'oxydases contenant du cuivre et inhibées par l'azoture (ou azide) qui est un inhibiteur classique des cuproprotéines. Ce problème a été revu assez récemment par FRANCIS et TEBO **[96]**. Il a des prolongements vers la circulation d'autres métaux dans l'environnement, puisque MnO_2 peut les oxyder à son tour, ou adsorber à sa surface différents radionucléides et métaux toxiques, facilitant leur élimination dans le traitement des eaux ou autres opérations de dépollution. La circulation des métaux dans l'environnement est une question importante qui éclaire certains cycles naturels, et cette question trouvera son prolongement au Chapitre 14.

3.11 - CYANURE - CYANATE - THIOCYANATE

Le cyanure a la réputation d'être un poison violent et figure habituellement sous forme d'anion CN^-. L'acide correspondant qui est le cyanure d'hydrogène (HCN) a un pK_a de 9,3, et l'anion domine largement à pH physiologique. La solution de cyanure de potassium à pH 7 est instable à cause de sa dissociation et de la perte de HCN. Celui-ci est volatil et moins dense que l'air, il s'élimine rapidement dans l'atmosphère où sa concentration devient très dangereuse à 300 ppm. Mais l'équilibre entre HCN et l'anion est facilement déplacé en faveur du second qui est fortement nucléophile. Il agit comme complexant des métaux (Ni, Fe, Cu, Zn, Au) et donne des cyanohydrines avec les groupes carbonyles. On sait que le cyanure se fixe facilement sur les ferriporphyrines des cytochromes, notamment dans la cytochrome oxydase, ce qui en fait un poison métabolique [14]. Le cyanure est à la fois un produit naturel et un polluant industriel. La production de cyanolipides ou de dérivés glycosidiques des alpha-hydroxynitriles est très répandue dans le règne végétal. La production de ces dérivés emprunte plusieurs voies à partir d'acides aminés par décarboxylation et transformation de l'amine en nitrile. Leur hydrolyse par la β-glucosidase provenant de champignons et de diverses espèces bactériennes, dont *Lactobacillus plantarum* **[97]**, libère le cyanure.

Une réaction intéressante est la production de HCN par certaines bactéries. *Pseudomonas aeruginosa* et *P. fluorescens* en font comme produit secondaire n'intervenant pas dans le métabolisme central de la cellule **[98]**. L'enzyme responsable est une oxydase flavinique membranaire qui oxyde la glycine en CO_2 et HCN. Ce système est induit quand les bactéries sont limitées en oxygène et entrent en phase stationnaire. Quelle est la fonction de ce curieux dispositif ? Les produits du métabolisme secondaire œuvrent souvent comme armes de défense ou de contrôle de la concurrence. Quand il est produit par des *Pseudomonas* logés sur les racines des plantes, le cyanure est peut-être un agent de lutte contre la multiplication des champignons. Cette fonction écologique possible reste à vérifier.

Les cyanures sont donc produits en continu et à petite dose dans l'environnement. L'industrie en libère éventuellement des quantités considérables par les activités minières, le traitement des métaux et la production de fibres synthétiques. Le cyanure ne s'accumule pas dans l'environnement, mais le danger des pollutions vient surtout des déversements brusques et abondants dans les rivières, avec leurs conséquences catastrophiques pour la faune piscicole. L'organisme des mammifères est armé pour se défendre contre les petites quantités de cyanure provenant de l'alimentation. L'enzyme de défense est la rhodanèse, qui est également répandue chez les micro-organismes, notamment les bactéries de la photosynthèse : *Chromatiuvinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Chlorobium limicola* et d'autres. L'enzyme est une transférase, prenant sur le

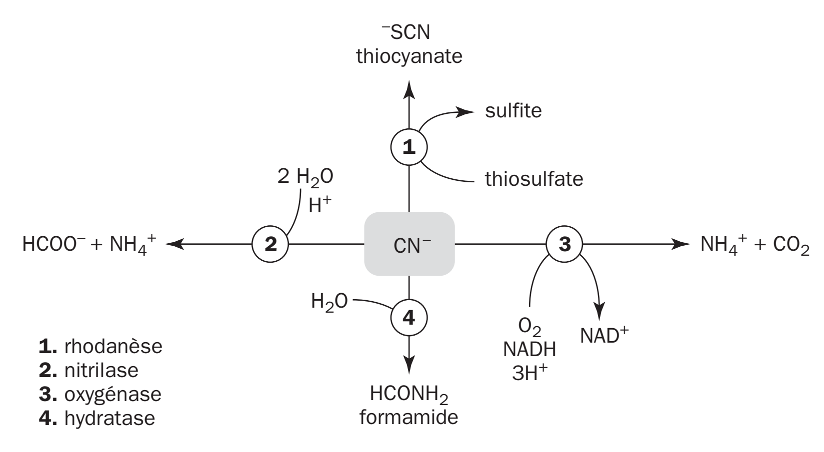
---

14 - L'action du cyanure sur la cytochrome oxydase mitochondriale a été démontrée pour la première fois avant 1930 par WARBURG et KEILIN. Toxicité mortelle chez l'homme à 1 mg par kg.

thiosulfate un atome de soufre (appelé sulfane) pour le placer sur un accepteur. Si celui-ci est un cyanure, il est transformé en thiocyanate :

$$S_2O_3^{2-} + KCN \longrightarrow SO_3^{2-} + KSCN$$

La détoxication du cyanure est donc une des fonctions de la **rhodanèse**. L'enzyme intervient aussi dans le métabolisme des thiols, et ne serait pas étranger à la formation des noyaux fer-soufre. La transformation du cyanure dans la nature est intéressante et peut suivre plusieurs voies résumées par ce schéma **[99]** :



Devenir du cyanure

Les réactions **2** et **3** permettent aux bactéries de récupérer l'azote sous forme ammoniacale. Le cyanure est alors utilisé comme seule source d'azote pour une croissance assez lente. La réaction **2** est catalysée par une nitrilase particulière (EC 3.5.5.1) décrite chez *Bacillus pumilus* **[100]**, *Alcaligenes xylooxidans* et un *Pseudomonas* **[101]**. Une formiate déshydrogénase est induite en même temps que la **nitrilase** et permet probablement de restaurer le NADH nécessaire à la réaction **3**. La voie **4** est peut-être une voie secondaire. La réaction **3** de la **cyanure oxygénase** a été décrite chez un *Pseudomonas fluorescens* et serait la plus importante **[102]**. Cette enzyme ressemble à une dioxygénase, coupant O_2 et incorporant les deux atomes dans le gaz carbonique. Elle fonctionne en fait comme une mono-oxygénase faisant parvenir seulement l'un des atomes d'oxygène au gaz carbonique, l'autre étant apporté indirectement par l'eau. Le cheminement serait le suivant :

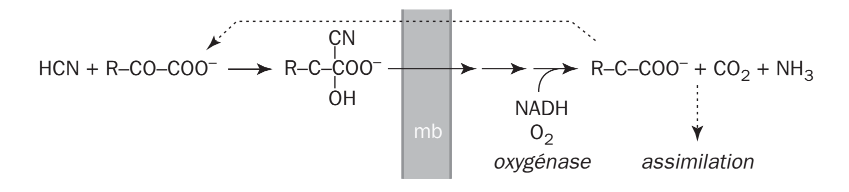
$$CN^- + O_2 + NADH + 2\,H^+ \longrightarrow [X\text{–}OH] + H_2O + NAD^+$$

(X–OH étant un produit carboné et azoté, qui pourrait être HOCN). Cette mono-oxygénation obéissant au modèle standard serait suivie d'une hydrolyse :

$$[X\text{–}OH] + H_2O \longrightarrow CO_2 + NH_3$$

Une variante de l'oxygénation du cyanure (réaction **3** du schéma métabolique) conduit à HOCN ou cyanate, attaqué par la cyanase. Nous y reviendrons un peu plus loin. KUNZ et coll. ont découvert un phénomène curieux **[103]**. Ils ont cultivé les

bactéries sur cyanure avec une limitation en azote. La présence du cyanure induit la mono-oxygénase. En observant la montée de celle-ci et la disparition du cyanure dans le milieu de culture de *Ps. fluorescens*, ils se sont aperçus qu'il n'y avait pas de concordance dans le temps. Une partie du cyanure disparaissait indépendamment de l'activité enzymatique induite. Ils ont constaté en outre que les bactéries excrétaient des oxoacides (pyruvate et 2-oxoglutarate), lesquels formaient avec le cyanure des cyanohydrines. Le cyanure se retrouvait alors piégé non enzymatiquement par ces oxoacides à l'extérieur de la cellule. On a pu voir que les cyanohydrines pouvaient servir de substrats azotés, mais que leur utilisation était soumise à la présence de l'oxygénase. Ce phénomène fait sans doute office de protection. La toxicité du cyanure dans le milieu est contrecarrée par l'action des oxoacides. Les cyanohydrines sont prises à l'intérieur de la cellule, métabolisés avec récupération du carbone et de l'azote tout à la fois. Il y a sans doute hydrolyse de ces cyanohydrines et libération de cyanure qui est traité à son tour par l'oxygénase. Cependant les modalités exactes restent à déterminer, ainsi que le va-et-vient d'oxoacides d'un compartiment à l'autre. La nature de l'oxygénase est inconnue, mais il s'agit peut-être d'une métallo-enzyme comme les autres oxygénases.



Revenons maintenant au **cyanate** (HOCN) [15]. Ce produit peut résulter d'une mono-oxygénation du cyanure (1), précédant une réaction sur bicarbonate (2) ou d'hydrolyse (3) par la **cyanase** (EC 4.2.1.104).

$$CN^- + O_2 + NADH + H^+ \longrightarrow N{=}C{=}O^- + H_2O + NAD^+ \quad (1)$$

$$N{=}C{=}O^- + HCO_3^- + 2\,H^+ \longrightarrow 2\,CO_2 + NH_3 \quad (2)$$

$$N{=}C{=}O^- + H_2O + H^+ \longrightarrow CO_2 + NH_3 \quad (3)$$

On pense généralement que la transformation de HCN en cyanate n'est pas une réaction métabolique importante, alors que la cyanase est une enzyme très répandue. Pourquoi ? La formation de $N{=}C{=}O^-$ résulterait surtout de la décomposition spontanée de l'urée et du *carbamyl-phosphate**, et n'aurait la plupart du temps rien à voir avec le cyanure. Le rôle de la cyanase serait donc de maintenir dans la cellule un niveau suffisamment faible de cyanate pour être toléré. La cyanase peut aussi mieux faire. *E. coli* K12 est muni d'une cyanase catalysant la réaction (2). Elle est produite par l'opéron *cynTSX* et inductible par l'azoture (ou azide, N_3^-) **[104]**. Cette enzyme CynS lui permet de se multiplier sur cyanate comme seule source azotée ! La protéine CynT codée par le même opéron est une

---

15 - Les questions de terminologie sont rappelées en glossaire à cyanate.*

anhydrase carbonique dont le rôle est peut-être de réhydrater le gaz carbonique en bicarbonate pour approvisionner la cyanase.

Le **thiocyanate** donne lieu à un problème similaire. Né de la réaction du soufre sur le cyanure, il est moins toxique que celui-ci, tout en étant un polluant de l'industrie chimique. Le thiocyanate a aussi une origine botanique. De nombreuses plantes fabriquent des glucosinolates (thioglucosides) qui sont très répandus chez les Crucifères. Par exemple la consommation de chou fait apparaître du thiocyanate dans le sang et dans la salive. L'hydrolyse de ces produits libère du thiocyanate en même temps par la rhodanèse. La dégradation du thiocyanate emprunte plusieurs voies. L'une d'elles a été analysée chez *Thiobacillus thioparus*, un chimio-lithotrophe capable de tirer son énergie du thiocyanate. Des auteurs japonais **[105]** ont mis en évidence une thiocyanate hydrolase transformant le substrat en **sulfure de carbonyle** (SCO) et ammoniac, selon un schéma impliquant deux intermédiaires. La première étape a des analogies avec l'hydratation d'un nitrile (RCN) et l'enzyme possède effectivement une homologie avec la famille des nitrilases. De façon générale les nitriles sont transformés en acide carboxylique par deux hydratations successives, la première par la nitrilase formant l'amide, grâce à laquelle une amidase libère l'ammoniac.

$$^{-}S{-}C{\equiv}N \xrightarrow{H_2O} {}^{-}S{-}C({=}O){-}NH_2 \xrightarrow[]{H_2O \;\; NH_3} {}^{-}S{-}C({=}O){-}OH \xrightarrow{OH^-} S{=}C{=}O$$

thiocyanate → sulfure de carbonyle

Thiocyanate hydrolase

Une deuxième voie d'attaque du thiocyanate a été décrite chez un Gram-négatif non clairement identifié et désigné comme souche 26B. Elle est fondée sur une première hydrolyse libérant du sulfure et du cyanate **[106]**. Le soufre est oxydé en thiosulfate puis en tétrathionate, qui est souvent le produit terminal de cette voie. Le thiocyanate est un substrat étonnant en ce qu'il peut servir à la fois de source d'énergie, de carbone, de soufre ou d'azote. Voilà bien des possibilités pour une molécule aussi simple ! L'oxydation du thiocyanate en sulfate, CO_2 et NH_3 libère au total 8 électrons. Les bactéries capables de se développer en autotrophie avec le thiocyanate comme donneur d'électrons sont généralement des *Thiobacillus*, notamment *T. thioparus*. Différentes catégories de bactéries hétérotrophes (*Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium thiocyanatum*) peuvent tirer leur azote du thiocyanate. Son attaque au cours de l'épuration d'eaux lourdement contaminées est faite par des associations bactériennes où dominent des germes tels que *T. thioparus*. L'utilisation du thiocyanate par des bactéries capables de se développer dans des milieux carbonatés fortement alcalins contenants de l'acétate (pH 10) a été démontrée récemment **[107]** Ces bactéries sont des associations d'autotrophes et d'hétérotrophes qui accumulent du cyanate, apparemment à la suite de l'hydrolyse du thiocyanate par la réaction (3) indiquée précédemment. Voici bien des possibilités et des transformations naturelles multiples qui auraient pu rester insoupçonnées !

Que devient le SCO formé ? Nous l'avons vu engendrer sous l'action de la thiocyanate hydrolase de *Thiobacillus thioparus*. Il se forme également à partir du **disulfure de carbone** (S=C=S). Ce composé mérite un bref détour. Liquide dense non-miscible à l'eau, inflammable et volatil, il est utilisé dans l'industrie de la viscose [16] et comme solvant des résines, caoutchoucs et graisses. Un *Paracoccus denitrificans* se développe en autotrophie en utilisant comme source d'énergie du succinate, du thiosulfate ou du disulfure de carbone. Celui-ci est transformé en sulfure de carbonyle par une oxygénase **[108]** Le devenir du SCO est en principe très simple. *T. thioparus* l'hydrolyse en $CO_2 + H_2S$. Mais le plus étonnant est sa réduction par la nitrogénase d'*Azotobacter vinelandii,* l'enzyme chargée en principe d'assimiler en ammoniac le diazote atmosphérique.

$$SCO + 2\,e^- + 2\,H^+ \longrightarrow H_2S + CO$$

L'un des produits de la réaction est du monoxyde de carbone, dont la formation a été mise en évidence par spectroscopie ou en le piégeant avec l'hémoglobine **[109]**. La nitrogénase est très sensible à la présence d'O_2 mais elle en est protégée à l'intérieur de la cellule par la grande activité des oxydations qui s'y déroulent. La nitrogénase fonctionne avec une ferrédoxine réduite comme source d'électrons, et de l'ATP comme source d'énergie. La nitrogénase peut réduire de toute façon les liaisons N–N, N–O, N–C ou C–C doubles ou triples. Elle accepte donc SCO comme substrat, mais le disulfure de carbone est un inhibiteur. Après réduction de SCO en CO, celui-ci est généralement oxydé en CO_2. Il est également substrat de la méthane mono-oxygénase !

La liste des possibilités n'est pas close pour autant. On en veut pour preuve la découverte d'un méthylotrophe facultatif, *Methylobacterium thiocyanatum*, capable d'utiliser le cyanate comme seule source d'azote, et le thiocyanate comme seule source à la fois d'azote et de soufre **[110]**. Ces bactéries cultivées sur méthanol possèdent un taux élevé d'hydroxypyruvate réductase et sont donc présumées utiliser le cycle de la sérine. Le thiocyanate serait transformé en cyanate, qui est attaqué à son tour par une cyanase très active fonctionnant avec du bicarbonate comme substrat selon la réaction (2) donnée antérieurement.

Cette discussion montre à la fois la variété, la complexité des transformations affectant ces dérivés, et l'intervention d'enzymes particulièrement polyvalentes. Du cyanure au thiocyanate, isothiocyanate, nitriles, cyanohydrines, sulfure de carbonyle et disulfure de carbone, on ne se serait pas attendu à une telle diversité d'interactions au sein de l'environnement.

---

16 - *Réaction de la cellulose traitée par la soude avec le sulfure de carbone, donnant des acides xanthogéniques de la cellulose (S=C(SH)-OR, où R est un alcoyle), servant à régénérer la cellulose par traitement acide.* CS_2 *se forme par réaction très endothermique du soufre sur le charbon à 900°C*

CONCLUSION BRÈVE

Ce chapitre nous a fait passer en revue rapidement l'incroyable variété des oxydations biologiques par l'air touchant des molécules carbonées, azotées, soufrées et des éléments métalliques. Des transformations cycliques s'entrecroisent et brassent d'une manière essentielle la circulation des éléments dans la biosphère sans laquelle les biodégradations, l'épuration biologique, seraient impossibles. Les deux chapitres suivants viendront compléter ce constat.

RÉFÉRENCES

[1] OWEN T (1982) *J. Mol. Evol.* **18** : 150-156.

[2] SCHLESSINGER G & Miller SL (1983) *J. Mol. Evol.* **19** : 376-382.

[3] KASTING JF (1993) *Science* **259** : 920-926.

[4] BATTLE M & coll. (1996) *Nature* **383** : 231-235.

[5] BOETIUS A, RAVENSCHLAG K, SCHUBERT CJ, RICKERT D, WIDDEL F, GIESEKE A, AMANN R, JØRGENSEN BB, WITTE U & PFANNKUCHE O (2000) *Nature* **407** : 623-626.

[6] HANSON RS & HANSON TE (1996) *Microbiol. Reviews* **60** : 430-471.

[7] BERGMANN DJ, ZAHN JA & DISPIRITO AA (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 991-997.

[8] NGUYEN HHT & coll. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** : 14995-15005.

[9] ZAHN JA & DISPIRITO AA (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 1018-1029.

[10] LIU Y , NEISHEIM JC, LEE SK & LIPSCOMB JD (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 24662-24665.

[11] ROSENZWEIG AC, FREDERICK CA, LIPPARD SJ & NORDLUNG P (1993) *Nature* **366** : 537-543.

[12] FOX BG & coll. (1989) *J. Biol. Chem.* **266** : 240-250 ;
FOX BG, Y. LIU, DEGE JE & LIPSCOMB JD (1991) *J. Biol. Chem.* **266** : 540-550.

[13] OLDENHUIS R & coll. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 3155-3161.

[14] LEE SK & coll. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** : 21569-21577;
LIU Y, NESHEIM JC, LEE SK & LIPSCOMB JD (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 24662-24665.

[15] WILKINS PC, DALTON H, SAMUEL CJ & GREEN J (1994) *Eur. J. Biochem.* **226** : 555-560.

[16] JAHNG D & WOOD TK (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 2473-2482.

[17] HOLMES AJ, COSTELLO A, LIDSTROM ME, MURRELL JC & coll. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* **132** : 203-208.

[18] MCTAVISH H, FUCHS JA & HOOPER AB(1993) *J. Bacteriol.* **175** : 2436-2444;
BERGMANN DJ & HOOPER AB (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **204** : 759-762.

[19] SCHIEMKE AK & coll. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **321** : 421-428.

[20] VANNELLI T, LOGAN M, ARCIERO DM & HOOPER AB (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 1169-1171.

[21] MEGRAW SR & KNOWLES R (1989) *Soil Biol. Biochem.* **89** : 11-20.

[22] WOLF HJ & HANSON RS (1980) *J. Gen. Microbiol.* **114** : 187-194;
SAHA Y & CHEN M (1989) Natl. Acad. Sci. Lett. **12** : 373-376.

[23] SCNELL S & KING GM (1995) *FEMS Microbiol. Ecol. Lett.* **4** : 285-294;
BENDER M & CONRAD R (1995) *Soil Biol. Biochem.* **27** : 1517-1527.

[24] GOODWIN PM & ANTHONY C (1998) *Adv. Microb. Physiol.* **40** : 1-80.

[25] DE VRIES GE, ARFMAN N, TERPSTRA P & DIJKHUIZEN L (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 5346-5353 ;
HEKTOR HJ, KLOOSTERMAN H & DIJKHUIZEN L (2002) *J. Biol. Chem.* **277** : 46966-46973.

[26] BYSTRYKH LV, GOVORUKHINA NI, DIJKHUIZEN L & DUINE JA (1997)
Eur. J. Biochem. **247** : 280-287.

[27] KEMP MB & QUAYLE JR (1967) *Biochem. J.* **102** : 94-102;
STROM T, FERENCI & QUAYLE JR (1974) *Biochem. J.* **144** : 465-476.

[28] NEWMAN LP & WACKETT LM (1995) *Biochemistry* **34** : 14066-14076 ;
SHIELDS MS, REAGIN MJ, GERGER RR, CAMPBELL R & SOMERVILLE C (1995)
Appl. Environ. Microbiol. **61** : 1352-1356 ;
DIJKHUIZEN L & coll. (1992) *In "Methane and methanol oxidizers"*, MURREEL JC & DALTON H eds, Plenum Press, N.Y.

[29] BOWMAN JP, SLY LI & STACKEBRANDT E (1995) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** : 182-185.

[30] DISTEL DL & CAVANAUGH CM (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 1932-1938 ;
DISTEL DL & CAVANAUGH CM (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** : 9598-9602.

[31] WACKETT LP, BRUSSEAU GA, HOUSEHOLDER SR & HANSON RS (1989)
Appl. Environ. Microbiol. **55** : 2960-2964 ;
ENSLEY BS (1991) *Annu. Rev. Microbiol.* **45** : 283-299.

[32] WILKINS PC, DALTON H & SAMUEL CJ & GREEN J (1994) *Eur. J. Biochem.* **226** : 555-560.

[33] MOTOSUGI K, ESAKI N & SODA K. (1982) *J. Bacteriol.* **150** : 522-527.

[34] FICH MW, GRAHAM DW, ARNOLD RG, AGARWAL SK, PHLEPS P, SPEITEL GE & GEORGIOU G (1993)
Appl. Environ. Microbiol. **59** : 2771-2776.

[35] JAHNG D & WOOD TK (1994) *Appl. Env. Microbiol.* **60** : 2473-2482.

[36] SHIELDS M.S. & coll. (1991) *Appl. Environ. Microbiol* **57** : 1935-1941;
SHIELDS MS, REAGIN MJ, GERGER RR, CAMPBELL R & SOMERVILLE C (1995)
Appl. Environ. Microbiol. **61** : 1352-1356.

[37] JEFFERS PM, WOLFE NL, NZENGUNG V (1998) *Geophys. Res. Lett.* **25** : 43-46.

[38] HARPER DB, HARVEY BMR, JEFFERS MR & KENNEDY JT (1999) *New Phytol.* **142** : 5-17.

[39] RHEW RC, MILLER BJ & WEISS RF (2000) *Nature* **403** : 292-294.

[40] HARPER DB, HARVEY BMR, JEFFERS MR & KENNEDY JT (1999) *New Phytol.* **142** : 5-17.

[41] HARPER DB (1993) Biogenesis and metabolic role of halomethanes in fungi and plants. *In Metal Ions in Biological Systems,* SIGEL H & SIGEL A eds, Marcel Dekker, New York : 345-388 ;
HARPER DB & HAMILTON JTG (1988) *J. Gen. Microbiol.* **134** : 2831-2839.

[42] VAN PEE KH (2001) *Arch. Microbiol.* 175 : 250-258.

[43] WUOSMAA AM & HAGER LP (1990) *Science* **249** : 160-162.

[44] WOLFARTH G & DIEKERT G (1997) *Curr. Opin. Biotecnol.* **8** : 290-295.

[45] VANNELLE T, STUDER A, KERTESZ M & LEISINGER T (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 1933-1936 ;
VANNELLE T,MESSMER M, STUDER A, VUILLEUMIER S & LEISINGER T (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** : 4615-4620.

[46] MCANULLA C, WOODALL CA, MCDONALD IR, STUDER A, VUILLEUMIER S, LEISINGER T & MURRELL JC (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 307-316.

[47] CHISTOSERDOVA L, VORHOLT JA, THAUER RK & LIDSTROM ME (1998) *Science* **281** : 99-102.

[48] MILLER LG, KALIN RM, MCCAULEY SE, HAMILTON JT, HARPER DB, MILLET DB, OREMLAND RS & GOLDSTEIN AH (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98** : 5833-5837.

[49] BUTLER JH (2000) *Nature* **403** : 260-261.

[50] MACFARLAND (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89** : 807-811.

[51] OREMLAND RS, LONERGAN DJ & CULBERTSON CW, LOVLEY DR (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 1818-1821.

[52] KRONE UE & THAUER RK (1992) *FEMS Microbiol.Lett.* 90 : 201-204.

[53] LEE RB, PURVES JV, RATTCLIFFE RG, SAKER LR (1992) *J. Exp. Bot.* **43** : 1385-1396 ;
FENTEM PA, LEA PL & STEWART GR (1983) *Plant Physiol.* **71** : 502-506.

[54] KRONZUCKER HJ, SIDDIQI Y & GLASS ADM (1997) *Nature* **385** : 59-61 ;
STARK JM & HART SC (1997) *Nature* **385** : 61-64.

[55] HOLMES AJ, COSTELLO A, LIDSTROM ME & MURRELL JC (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* 132 : 203-208.

[56] JULIETTE LA, HYMAN MR & ARP DJ (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3718-3727 et 3728-3735.

[57] IGARASHI N, MORIYAMA N, FUJIWARA H, FUKUMORI T & TANAKA Y, (1997) *Nature Struct. Biol.* **4** : 276-284.

[58] IVERSON TM, ARCIERO DM HSU BT, LOGAN MSP, HOOPER AB & REES DC (1998) *Nature Struct. Biol.* **5** : 1005-1012.

[59] HOMMES NG, SAYAVEDRA-SOTO LA & ARP DJ (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 1096-1100.

[60] FUKUOKA M, FUKUMORI Y & YAMANAKA T (1987) *J. Biochem.* (Tokyo) **102** : 525-530.

[61] YAMANAKA T & FUKUMORI Y (1988) *FEMS Microbiol. Rev.* **4** : 259-270.

[62] JURETSCHKO S, TIMMERMANN G, SCHMID M, SCHLEIFER K-H, POMMERENING-RÖSER A, KOOPS HP & WAGNER M (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 3042-3051.

[63] BARTOSCH S, HARTWIG C, SPIECK E & BOCK E (2002) *Microbial Ecol.* **43** : 26-33.

[64] ANDREWS JH & HARRIS RF (1986) *Adv. Microbiol. Ecol.* **9** : 99-147.

[65] VAN DE GRAAF AA, MULDER A, DE BRUIJN P, JETTEN MSN, ROBERTSON LA & KUENEN JG (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 1246-1251 ;
STROUS M, KUENEN JG & JETTEN MSN (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 3248-3250.

[66] LINDSAY MR, WEBB RI, STROUS M, JETTEN MS, BUTLER MK, FORDE RJ & FUERST JA (2001) *Arch. Microbiol.* **174** : 413-429.

[67] DAMSTÉ JSS, STROUS M, RIJPSTRA WIC, HOPMANS EC, GEENEVASEN JAJ, VAN DUIN ACT, VAN NIFTRIK LA & JETTEN MSM (2002) *Nature* **419** : 708-712.

[68] CYPIONKA H & MEYER O (1983) *J. Biol. Chem.* **156** : 1178-1187.

[69] JACOBITZ S & MEYER O (1986) *Arch. Microbiol.* **145** : 372-377.

[70] M. KRAUT & coll. (1989) *Arch. Microbiol.* **152** : 335-341.

[71] HILLE R (1996) *Chem. Rev.* **96** : 2757-2816.

[72] DOBBEK H, GREMER L, MEYER O & HUBER R (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** : 8884-8889.

[73] THAUER RK, JUNGERMANN K & DECKER K (1977) *Bacteriol. Rev.* **41** : 100-181 ;
BITTERER H, cité par BRUNE DC (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **975** : 189-221.

[74] OH JI & KAPLAN S (1999) *Biochemistry* **38** :2688-2696.

[75] DE GIER JW, SCHEPPER M, REIJNDERS WN, VAN DYCK SJ, SLOTBOOM DJ, WARNE A, SARASTE M, KRAB K, FINEL M, STOUTHAMER AH, VAN SPANNING RJ & VAN DER OOST J (1996) *Mol. Microbiol.* **20** : 1247-1260.

[76] VISSER JM, DE JONG GAH, ROBERTSON LA & KUENEN JG (1996) *Arch. Microbiol.* **166** : 372-378.

[77] MEULENBERG R, PRONK JT, FRANK J, HAZEU W, BOS P & KUENEN JG (1992) *Eur. J. Biochem.* **209** : 367-374.

[78] VISSER JM, ROBERTSON LA, VAN VERSEVELD HK & KUENENJG (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 2300-2305.

[79] HALLBERG KB, DOPSON M, LINDSTRÖM B (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 6-11.

[80] VISSER JM, DE JONG GAH, ROBERTSON LA & KUENEN JG (1997) *Arch.Microbiol.* **167** : 295-301.

[81] HAGEN WR, SILVA PJ, AMORIM MA, HAGEDOORN PL, WASSINK H, HAAKER H & ROBB FT (2000) *J. Biol. Inorg. Chem.* **5** : 527-534.

[82] FRIEDRICH CG (1998) *Adv. Microbiol. Physiol.* **39** :235-289.

[83] KAPPLER U, BENNETT B, RETHMEIER J, SCHWARTZ G, DEUTZMANN R, MCEWAN AG & DAHL C (2000) *J. Biol. Chem.* **275** : 13202-13212.

[84] FRITZ G, BUCHERT T, HUBER H, STETTER KO & KRONECK PM (2000) *FEBS Lett.* **473** : 63-66.

[85] BRÜSER T, SELMER T & DAHL C (2000) *J. Biol. Chem.* **275** : 1691-1698.

[86] SUNDA W, KIEBER DJ, KIENE RP & HUNTSMAN S (2002) *Nature* **418** : 317-320.

[87] GAGE DA, RHODES D, NOLTE KD, HICKS WA, LEUSTEK T, COOPER AJL & HANSON AD (1997) *Nature* **387** : 891-894.

[88] KELLY DP & SMITH NA (1989) *Adv. Microbiol. Ecol.* **11** : 345-385.

[89] SMITH NA & KELLY DP (1988) *J. Gen. Microbiol.* **134** : 3031-3039.

[90] DE BONT JAM, VAN DIJKEN JP & HARDER W (1981) *J. Gen. Microbiol.* **127** : 315-323 ;
SUYLEN GMH, LANGE PJ, VAN DIJKEN JP & KUENEN JG (1987) *J. Gen. Microbiol.* **133** : 2989-2994 ;
VISSCHER PT & TAYLOR BF (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3784-3789.

[91] KELLY DP & MURRELL JC (1999) *Arch. Microbiol.* **172** : 341-348.

[92] KUCERA S & WOLFE RS (1957) *J. Bacteriol.* **74** : 344 ;
HALLBECK L, STAHL T & PEDERSEN K (1993) *J. Gen. Microbiol.* **139** : 1531-1535.

[93] SUGIO T, MIZUNASHI W, INAGAKI K & TANO T (1987) *J. Bacteriol.* **169** : 4916-4922.

[94] NAGAOKA T, OHMURA N & SAIKI H (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 3588-3593.

[95] ADAMS LF & GHIORSE WC (1987) *J. Bacteriol.* **169** : 1279-1285 ;
BOOGERD RC & DE VRIND JPM (1987) *J. Bacteriol.* **169** : 489-494 ;

CORSTJENS PLAM, DE VRIND JPM, GOOSEN T & DE VRID-DE JONG EW (1997) *Geomicrobiol. J.* **14** : 91-108.

[96] FRANCIS CA & TEBO BM (1999) *J. Mol. Biotechnol.* **1** : 71-78.

[97] LEI V, AMOA-AWUA WK & BRIMER L (1999) *Int. J. Food Microbiol.* **53** : 169-184.

[98] BLUMER C & HAAS D (2000) *Arch. Microbiol.* **173** : 170-177.

[99] KUNZ DA, NAGAPPAN O, SILVA-AVALOS J & DELONG GT (1992) *Microbiology* **140** : 1705-1712.

[100] MEYERS PR, RAWLINGS DE, WOODS DR & LINDSEY GG (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 6105-6112.

[101] WHITE JM, JONES DD, HUANG D & GAUTHIER JJ (1988) *J. Ind. Microbiol.* **3** : 263-272.

[102] HARRIS RE & KNOWLES CJ (1983) *J. Gen. Microbiol.* **129** : 1005-1011 ;
WANG CS, KUNZ DA & VENABLES BJ (1996) *Appl. Environ. Microbiol*. **62** : 2195-2197.

[103] KUNZ DA, CHEN JL & GUANGLIANG P (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4452-4459.

[104] LAMBLIN AF & FUCHS JA (1994) J. Bacteriol. **176** : 6613-6622.

[105] KATAYAMA Y, MATSUSHITA Y, KANEKO M, KONDO M, MIZUNO T & NYUNOYA H (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 2583-2589.

[106] STRATFORD J, DIAS AE, KNOWLES CJ (1994) *Microbiology* **140**(Pt 10) : 2657-2662.

[107] SOROKIN DY, TOUROVA TP, LYSENKO AM & KUENEN JG (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 528-538.

[108] JORDAN SL, MCDONALD IR, KRACZKIEWICZ-DOWJAT AJ, KELLY DP, RAINEY FA, MURRELL JC & WOOD AP (1997) *Arch.* **168** : 225-236.

[109] SEEFELDT LC, RASCHE ME & Ensign SA (1995) *Biochemistry* 34 : 5382-5389.

[110] WOOD AP, KELLY DP, MCDONALD IR, JORDAN SL, MORGAN TD, KHAN S, MURRELL JC & BORODINA E (1998) *Arch. Microbiol.* **169** : 148-158.

CHAPITRE 4
HYDROGÈNE - ACÉTATE - MÉTHANE

Ce chapitre concerne des transformations qui se déroulent pour l'essentiel à l'abri de l'air. L'hydrogène, l'acide acétique et le méthane représentent un important courant de matière dans la biosphère, et sont des intermédiaires incontournables de la chimie de l'environnement. Des mécanismes biochimiques inédits sont mis en jeu. Une part importante de ce chapitre sera consacré à la synthèse du méthane, gaz à effet de serre, dont le mécanisme détaillé a été démonté récemment. Les organismes responsables sont probablement parmi les plus anciens dans l'histoire de la vie, bien avant la montée de l'oxygène atmosphérique et le développement des oxydations aérobies.

4 – Hydrogène - acétate - méthane

Ce chapitre concerne des transformations qui se déroulent pour l'essentiel à l'abri de l'air. L'hydrogène, l'acide acétique et le méthane représentent un important courant de matière dans la biosphère, et sont des intermédiaires incontournables de la chimie de l'environnement. Ce ne sont pas les seuls, mais nous commençons par ceux qui sont probablement parmi les plus anciens dans l'histoire de la vie, bien avant la montée de l'oxygène atmosphérique et le développement des oxydations aérobies.

4.1 - Hydrogène et hydrogénases

Les hydrogénases métabolisent l'hydrogène moléculaire selon l'équilibre réversible théorique :

$H_2 \rightleftarrows 2H^+ + 2e^-$ selon le potentiel standard E'° = – 430 mV (à pH 7).

Les électrons sont fournis ou captés par un donneur ou un accepteur selon le sens dans lequel fonctionne la réaction. Dans la réaction de gauche à droite, l'hydrogène diatomique est scindé sur un métal de façon hétérolytique en ion hydrure et proton ($H_2 \rightarrow H^- + H^+$). L'oxydation porte sur l'hydrure, qui émet le deuxième proton et deux électrons. En étant réversible, ce mécanisme provoque un échange de deutérium entre H_2 et D_2 et entraîne la formation de HD. L'oxydation de l'hydrogène s'effectue selon trois modes privilégiés. Le premier utilise typiquement O_2 comme accepteur par l'intermédiaire d'une chaîne respiratoire. De nombreuses espèces bactériennes chimio-lithotrophes en tirent de l'énergie, et sont d'ailleurs souvent des autotrophes, c'est-à-dire utilisatrices de CO_2 comme seule source de carbone. Le second mode est celui des bactéries phototrophes anaérobies utilisatrices de H_2 comme source d'électrons pour l'assimilation de CO_2, la source d'énergie principale étant évidemment la lumière. Enfin le troisième mode s'observe chez les bactéries méthanogènes qui peuvent employer H_2 comme source d'électrons dans la réduction de CO_2 en méthane. La réaction inverse aboutit à la formation d'hydrogène. Elle s'observe dans diverses réactions de fermentation où H_2 apparaît comme produit conjointement à d'autres entités qui sont des composés organiques et CO_2. Comme nous l'avons constaté, la production d'hydrogène correspond à l'évacuation d'un excédent de pouvoir réducteur. C'est pourquoi elle peut s'observer également chez les phototrophes, quand l'abondance d'énergie lumineuse engendre un excès de pouvoir réducteur par rapport aux cibles à assimiler, comme CO_2 ou N_2. Il y a

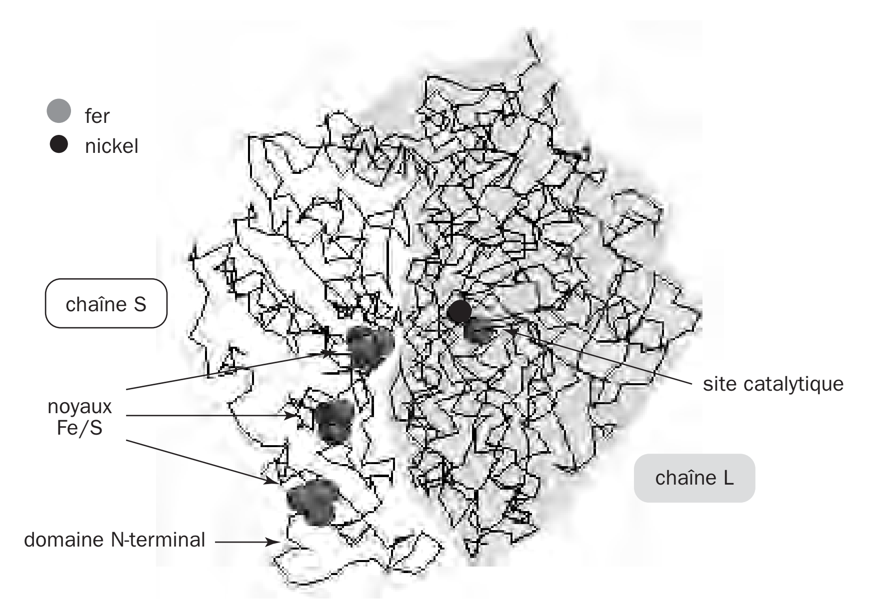
donc un véritable cycle de l'hydrogène dans la nature faisant alterner consommation et production. Ces deux volets mettent en lice des enzymes distinctes, qui sont presque toutes des protéines fer-soufre. Celles qui consomment H_2 sont des **hydrogénases [NiFe]** renfermant du nickel, parmi lesquelles certaines ont aussi du sélénium, les **hydrogénases [NiFeSe]**. Les secondes produisent de l'hydrogène, n'ont ni sélénium ni nickel, et sont les **hydrogénases [Fe]**. Une revue récente sur ce sujet a été publiée par P.M. VIGNAIS et A. COLBEAU **[1]**.

Les hydrogénases sont donc des enzymes essentiellement procaryotiques. Elles n'appartiennent pas qu'aux bactéries effectuant des fermentations car elles s'observent chez les phototrophes, les acétogènes, les réducteurs des composés soufrés, du nitrate et du fumarate, ainsi que chez les archaebactéries méthanogènes. De façon générale les hydrogénases occupent une position centrale dans le métabolisme anaérobie, probablement depuis les temps les plus anciens de l'évolution biologique.

Malgré sa participation essentielle à la chimie de l'environnement, l'hydrogène moléculaire ne s'accumule jamais à forte concentration. On peut y voir plusieurs explications. La première est la propriété du gaz H_2 de diffuser très rapidement et de s'échapper dans l'atmosphère. Ensuite l'hydrogène est un excellent carburant pour les oxydations biologiques, et se voit très avidement consommé au fur et à mesure de sa production. Enfin l'hydrogène est lui-même toxique dès que sa concentration s'élève, en abaissant exagérément le potentiel redox du milieu et en freinant les fermentations. La production biologique de H_2 est néanmoins une perspective bien tentante pour l'obtention d'un carburant énérgétique propre, dont la combustion ne produit que de l'eau. Des recherches ont été entreprises dans ce sens depuis la crise pétrolière des années 70. La difficulté d'obtenir de l'hydrogène en grande quantité et à bas prix à l'aide de cultures biologiques est un obstacle important. Il n'a pas été renoncé à cet objectif pour autant. En particulier des micro-algues telles que les *Chlamydomonas* pourraient devenir des outils intéressants pour cela **[2]**.

Les **hydrogénases [NiFe]** sont communément périplasmiques ou membranaires. Les premières analyses structurales **[3]** ont porté sur les bactéries appartenant au genre *Desulfovibrio*, où la réduction des ions sulfate peut s'effectuer à partir de l'hydrogène comme source d'électrons. La complexité de ces enzymes contraste avec la simplicité de la réaction catalysée. On y rencontre deux sous-unités inégales, L et S (de 60 et 28 kDa respectivement), plusieurs centres fer-soufre et des ligands inattendus **[4]** comme CO, et CN^-. Le nickel est lié à quatre résidus de cystéine par les atomes de soufre et fait partie avec le fer d'un centre bi-métallique. Une étude phylogénétique détaillée sur la base des séquences et des fonctions a permis de distinguer au moins 4 groupes différents dans ces enzymes **[5]**.

La figure montre l'architecture des deux parties de l'hydrogénase de *Desulfovibrio vulgaris*. La petite sous-unité S contient trois centres fer-soufre (dont deux [4Fe-4S] de part et d'autre d'un [3Fe-4S]), formant comme un fil conducteur à partir du domaine N-terminal jusqu'au site catalytique de la sous-unité partenaire. La structure de S ressemble à celle d'une *flavodoxine**, et l'on pense que les électrons partent de ce côté sur un accepteur qui serait une ferrédoxine.



Hydrogénase NiFe de Desulfovibrio vulgaris

Du volume important de travaux déjà consacrés aux hydrogénases [NiFe] par les méthodes génétiques, cinétiques et physiques, le plus étonnant est sans doute la structure du site catalytique contenant du nickel et du fer. L'enzyme contient également un ion magnésium dont la fonction est inconnue.

La rupture de la molécule de H_2 par oxydation se fait probablement au niveau du fer et des ligands très spéciaux qu'il porte figurés sur le dessin. La structure hypothétique est celle de l'enzyme oxydée, les métaux étant pontés par le soufre appartenant à deux résidus de cystéine. Des remaniements dans la coordination des deux métaux et les ponts soufrés auraient lieu au cours de l'oxydoréduction. Dans l'enzyme oxydée de *D. gigas*, un atome d'oxygène occuperait la position X entre le fer et le nickel.

La grande sous-unité renferme un ion magnésium lié spécifiquement à la chaîne polypeptidique. Dans l'enzyme au repos, les deux métaux sont à l'état Fe(II) et Ni(II) **[6]** et passent à l'état Fe(II) et Ni(III) au cours du cycle. En bref, l'hydrogène subirait une coupure hétérolytique en H^- et H^+ sur le fer. Celui-ci retiendrait l'hydrure (H^-) en laissant partir le proton capté par l'un des thiolates Cys-S^- qui entourent le nickel. Comme le cycle réactionnel n'est pas encore totalement établi, nous le laisserons de côté, mais il est certain que les deux métaux collaborent pour oxyder l'hydrure en $H^+ + 2e^-$. La structure détaillée de l'enzyme a montré la présence d'un chemin pour l'arrivée de H_2, l'expulsion des deux protons successifs, la canalisation des électrons vers la petite sous-unité. Les centres [4Fe-4S] fonctionnent à bas potentiel (vers – 350 mV), alors que le [3Fe-4S] qui les sépare a un potentiel plus élevé (– 35 mV). C'est une énigme de plus dans cette mécanique sophistiquée. Le

noyau [3Fe-4S] n'existe pas dans toutes les hydrogénases homologues, et certains auteurs pensent même qu'il n'a aucune fonction essentielle. Une nouvelle hydrogénase appartenant à un type particulier (HupUV) **[7]** a été mise en évidence dans le cytoplasme de *Rhodobacter capsulatus*. Elle sert de système de détection et de régulation commandé par l'hydrogène gazeux. À noter que les enzymes [NiFe] appartiennent à plusieurs classes et participent à une variété de fonctions physiologiques. Certaines déshydrogénases sont associées à d'autres protéines liées à la membrane pour former un complexe avec des déshydrogénases liant $NAD(P)^+$ ou du F420 (méthanogènes, Section 5). C'est un sujet vaste et complexe qui soulève une grand intérêt [1].

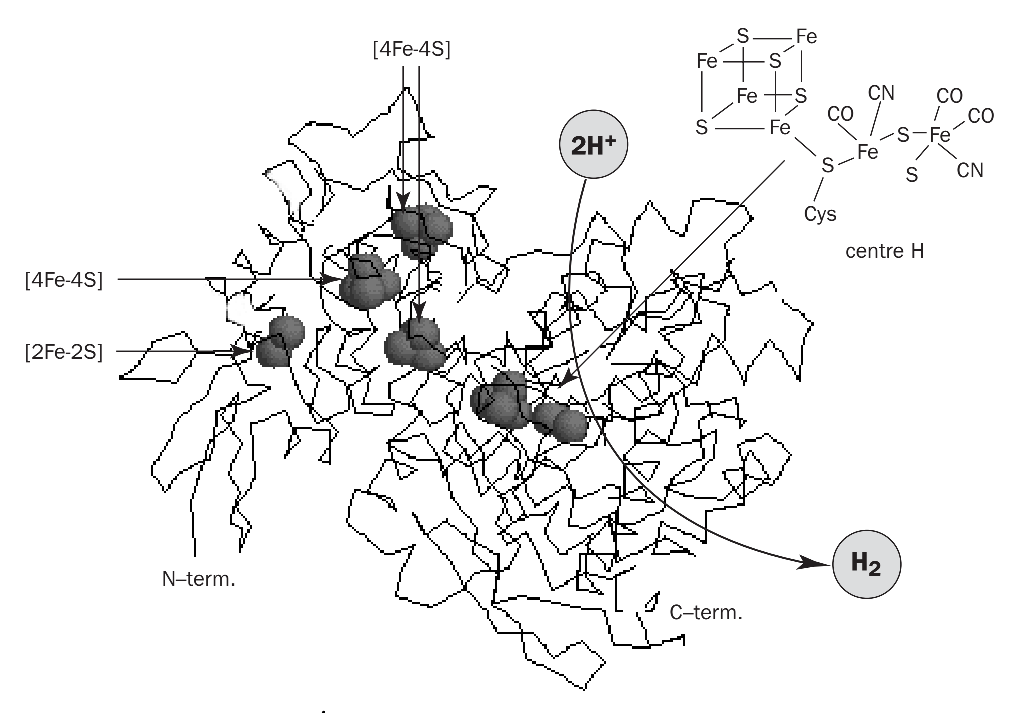
Le sélénium des **hydrogénases [NiFeSe]** fait partie de la *sélénocystéine**, une cystéine déguisée où le sélénium remplace le soufre. La sélénocystéine prend la place d'un résidu de cystéine lié au nickel, dont la réactivité se verrait renforcée par le voisinage du sélénium. Ces hydrogénases qui ont une structure très voisine de celle des [NiFe], sont répandues chez les bactéries sulfato-réductrices et les archaebactéries. À part la présence de cette sélénocystéine, il y a quelques différences avec les [NiFe]. Le fer remplace le magnésium aperçu dans la sous-unité L de l'enzyme précédente, et le noyau [3Fe-4S] de la petite sous-unité est remplacé par un [4Fe-4S]. La structure de l'hydrogénase [Ni/Fe/Se] chez *Desulfomicrobium baculatum* a été déterminée **[8]**. La comparaison avec l'hydrogénase à nickel et fer mais sans sélénium montre que l'organisation reste sensiblement la même. On y retrouve des ligands exotiques comme CO et CN^- fermement liés au métal et identifiés par des méthodes chimiques et spectroscopiques **[9]**. Avec ou sans sélénium, les deux déshydrogénases appartiennent visiblement à la même famille structurale.

Les **hydrogénases [Fe]**, dites à fer seul, diffèrent totalement des précédentes, malgré des analogies qui résultent d'une évolution convergente. Ces enzymes ont été analysées plus tardivement, car elles sont plus sensibles à O_2 et moins commodes à manipuler. Elles sont fortement inhibées par le monoxyde de carbone et le nitrite. Ces hydrogénases sont plus souvent productrices d'hydrogène moléculaire que consommatrices. Les mieux connues sont maintenant celles de *Clostridium pasteurianum* et de *Desulfovibrio desulfuricans* [2]. Les hydrogénases [Fe] sont très performantes dans les conditions optimales, et peuvent produire de 6000 à 9000 molécules de H_2 par seconde à 30°C. C'est pourtant une machinerie compliquée, dont on connaît maintenant la structure chez *Clostridium* **[10]**. Son hydrogénase est cytoplasmique, n'a qu'une seule chaîne de 438 résidus et contient 5 groupes fer-soufre, soit un [2Fe-2S], trois [4Fe-4S] et un "**centre H**" plus complexe contenant deux atomes de fer portant chacun des ligands CO et CN^-. Ces deux Fe sont liés à la protéine par des résidus de cystéine, et l'un d'eux est lié par cystéine à un centre [4Fe-4S]. Le lobe N-terminal, à gauche du dessin, est la partie qui reçoit les électrons nécessaires à la production de H_2. L'enzyme de *Desulfovibrio* est

1 - *Sur le plan fondamental bien sûr, mais aussi dans les perspectives appliquées pour produire l'hydrogène !*

2 - *Ces bactéries ont donc à la fois des hydrogénases qui consomment de l'hydrogène, et d'autres qui en produisent. La localisation de ces enzymes dans la cellule n'est pas la même et elles participent à un cycle interne de l'hydrogène.*

localisée dans son périplasme. Le centre H qui s'y trouve est un peu différent du précédent et les groupes [2Fe-2S] et [4Fe-4S] voisins manquent. Par contre l'enzyme a une sous-unité supplémentaire qui serait nécessaire à son exportation dans le périplasme.



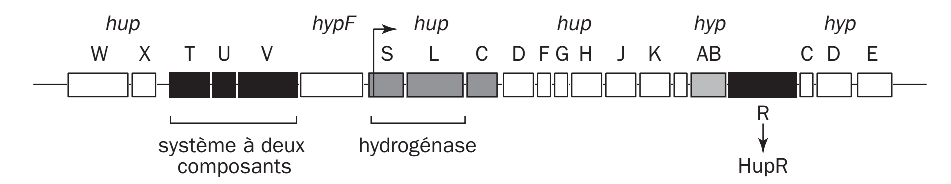
Hydrogénase [Fe] de Clostridium pasteurianum

Imiter les performances des hydrogénases [Fe], tel est le challenge pour le futur, et donne lieu à des recherches de modélisation **[11]**. En somme les bactéries nous montrent la voie pour fabriquer peut-être des quantités inépuisables du carburant hydrogène. Ce rêve deviendra-t-il réalité ?

4.2 - Les hydrogénases sont régulées

Le métabolisme de l'hydrogène fait le lien entre divers secteurs de l'économie cellulaire en conditions anaérobies ou micro-aérobies lorsque le potentiel redox est suffisamment bas. Les hydrogénases répondent à des problèmes précis et ne sont synthétisées que lorsque les conditions garantissent leur utilité. Les micro-organismes ont souvent plusieurs hydrogénases appartenant à différents types, chacune d'elles étant adaptée à une situation particulière. L'oxydation de H_2 peut alimenter en électrons l'assimilation de CO_2 en autotrophie, la réduction de l'azote en ammoniac, la réduction du nitrate, du fumarate, ou une gamme assez étendue d'accepteurs susceptibles d'intervenir en anaérobiose.

L'assemblage des hydrogénases est sous la dépendance de nombreux gènes qui commandent la synthèse des sous-unités, leur maturation et leur transport (notamment pour les enzymes périplasmiques), l'acquisition et le transport des métaux ainsi que l'insertion des groupes annexes tels que CO et CN. Voici par exemple la région génomique dont dépend l'hydrogénase [NiFe] de *Rhodobacter capsulatus* par les gènes *hup* (pour *hydrogen uptake*) :



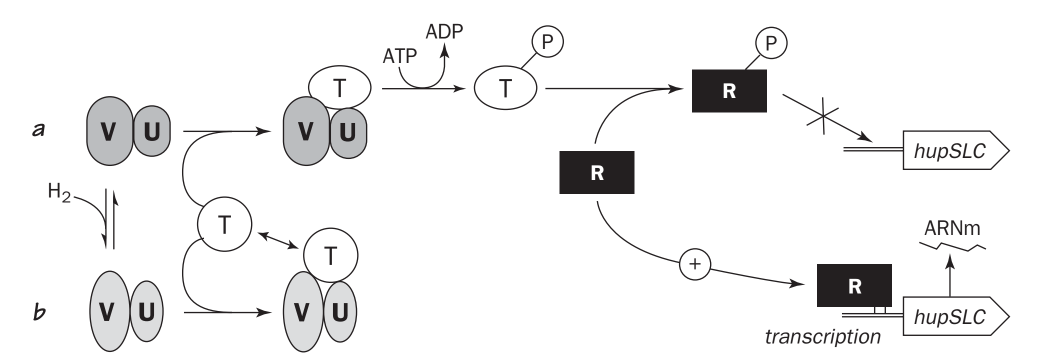
Les loci hup et hyp de R. capsulatus

Les deux sous-unités de hydrogénase proprement dite sont codées par *hupS* et *hupL*. Le gène *hupC* code pour un cytochrome b, un accepteur d'électrons associé à hydrogénase. Les trois gènes sont transcrits d'une seule pièce à partir d'un promoteur (petite flèche), de telle sorte que les polypeptides correspondants sont synthétisés de façon concertée. Tous les autres gènes concernent des opérations de service ou de contrôle. Les gènes *hypF*, *hypAB*, *hypCDE* sont concernés par le transport et l'introduction dans l'enzyme du nickel et du fer associés à leurs ligands CO et CN^-. La protéine HypB lie ce métal et fonctionne comme une GTPase, tandis que HypC interviendrait dans la maturation de la sous-unité catalytique HupL de l'enzyme. HypF est apparemment responsable de l'introduction des groupes CO et CN^- dans le site catalytique de hydrogénase. L'exportation des deux sous-unités de l'hydrogénase après assemblage et maturation se fait à l'aide du système Tat récemment découvert. Il fait partie des mécanismes de transport chargés d'insérer diverses protéines dans la membrane ou de les amener dans le périplasme **[12]**. Ces indications sommaires sont données à titre d'exemple, les solutions pouvant varier d'une espèce à l'autre, mais elles permettent de réaliser combien la mise en place d'une hydrogénase fonctionnelle nécessite un véritable arsenal de moyens moléculaires !

Le plus intéressant revient aux gènes *hupR*, *hupTUV*. Ils déterminent des facteurs régulateurs. L'activité hydrogénase de *R. capsulatus* est forte en présence de H_2, grâce à la transcription des gènes *hupSLC*. C'est l'inverse quand H_2 disparaît du milieu. Il y a donc un mécanisme de détection relatif à la présence ou non de H_2. Cette fonction appartient à **HupU** et **HupV**. Les deux polypeptides forment un complexe qui ressemble à hydrogénase HupSL par sa structure et ses propriétés. C'est une deuxième hydrogénase **[13]**. Les mutants dépourvus de HupUV conservent une forte activité hydrogénase, même quand il n'y a plus d'hydrogène dans le milieu. Que fait cette hydrogénase régulatrice ? Elle sert de capteur, un peu à la manière d'une électrode à hydrogène. En présence de H_2, elle subit un changement de conformation qui est perçu et transmis vers **HupR**, la protéine qui va décider si les gènes *hupSLC* seront transcrits ou non. Ce système est un cas de régulation à deux composants, dont le principe est très répandu chez les bactéries. On y voit une kinase et un régulateur. La kinase est une protéine qui se phosphoryle

elle-même sur histidine à la suite de la réception d'un signal. Elle rejette alors son phosphate sur la deuxième protéine, le régulateur, qui s'associe à l'ADN au voisinage des gènes dont il régule la transcription. Toutes ces paires de protéines présentent des domaines conservés reconnaissables par des homologies de séquence et des ressemblances structurales. La régulation à deux composants se fait donc ici par **HupT** (la kinase) et **HupR** (le régulateur) **[14]**. Un dessin nous aidera à comprendre le mécanisme **[15]**.

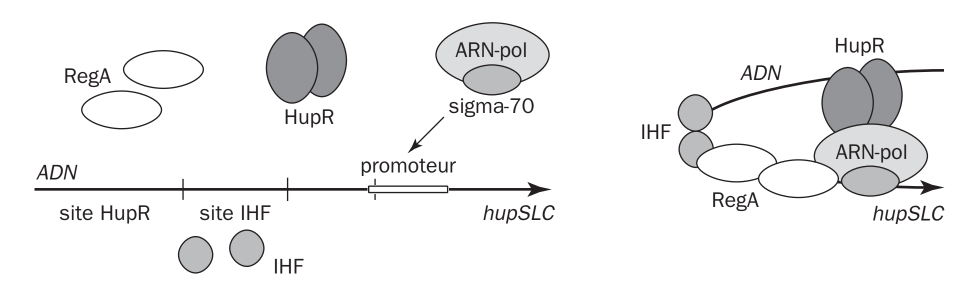
Le complexe HupUV reconnaît donc l'hydrogène. Il interagit avec la kinase HupT et l'empêche de s'autophosphoryler en présence de H_2. En A, il n'y a pas d'hydrogène. Le facteur HupT est alors libre de s'autophosphoryler sur histidine. Il phosphoryle à son tour HupR et bloque ainsi son action comme activateur. En B, l'autophosphorylation de HupT est empêchée. Comme la protéine HupR n'est pas modifiée, elle active la transcription des gènes *hupSLC* de l'hydrogénase **[16]**. Cette opération est réversible parce que HupR non phosphorylée est une phosphatase qui hydrolyse la liaison du phosphate sur HupT, et cette action antagoniste de la phosphorylation autorise un réglage fin entre les deux actions contraires. Le système de régulation à deux composants HupT/HupR se comporte de manière exceptionnelle, car dans les régulations de ce type, c'est généralement la forme phosphorylée du régulateur qui active la transcription, alors qu'ici HupR-P fait l'inverse.



Régulation de hup SLC

Cette cascade d'effets est donc placée sous la dépendance de l'hydrogène et participe au contrôle du potentiel redox de la cellule. *R. capsulatus* est une espèce photo-autotrophe capable d'assimiler le dioxyde de carbone, de réduire l'azote atmosphérique et de faire une respiration sur O_2. Cette dernière met à contribution l'hydrogénase HupSL pour lancer des électrons dans la chaîne respiratoire, et fournir ainsi de l'énergie à plusieurs chaînes métaboliques grâce à l'aérobiose. Dans le même temps les différentes activités sensibles à l'oxygène comme l'assimilation de l'azote et la photosynthèse sont freinées. Cette situation est renversée au cours de l'anaérobiose. D'où la nécessité d'un contrôle général qui permet de coordonner tout cela. L'opéron *hupSLC* est contrôlé par HupR, mais dépend aussi chez *Rhodobacter* d'un second régulateur d'action plus générale qui est ici la protéine **RegA**. Celle-ci contrôle non seulement *hupSLC* mais des gènes de la photosynthèse, de l'assimilation de CO_2, de la respiration et de la nitrogénase, une régulation globale !

Pour que l'action de l'ARN-polymérase puisse commencer à transcrire en amont d'un groupe de gènes, il faut qu'elle reconnaisse la séquence d'un promoteur par l'intermédiaire d'un *facteur sigma** ou *facteur d'amorçage**. Dans bien des cas, elle a le feu vert pour déclencher seule le processus. Dans d'autres cas, il lui faut un régulateur, soit pour activer la transcription, soit au contraire pour l'interdire (contrôle négatif). RegA est un régulateur négatif pour *hupSLC* et pour son propre gène. Les différentes protéines régulatrices interagissent avec la polymérase et s'installent sur l'ADN en des zones spécifiques, le plus souvent sous forme de dimères. Le site d'attachement de HupR sur l'ADN est relativement distant du promoteur, mais le schéma explique comment les protéines HupR et RegA peuvent se regrouper pour interagir avec l'ARN-polymérase :



La solution est fondée sur la courbure de la double hélice d'ADN avec l'aide de **IHF***, permettant à HupR d'entrer en contact avec la polymérase. Le site d'attachement de RegA chevauche en partie le promoteur à la façon d'un répresseur, mais déborde aussi sur le site de liaison de IHF. Or RegA est elle-même soumise à régulation. Elle fait partie à son tour d'un système à deux composants, **RegB/RegA**. Le composant RegB est une kinase membranaire, tandis que RegA est cytoplasmique. D'après un schéma publié par ELSEN et coll. **[17]**, RegA phosphorylée active la synthèse des photorécepteurs, des enzymes du cycle de CALVIN, de la nitrogénase et des cytochromes respiratoires. Mais sa phosphorylation renforce son attachement à l'ADN devant l'opéron *hupSLC*, dont elle entraverait l'expression. Il a été montré récemment par SWEM et coll. que RegB est sensible à des conditions oxydantes causées par O_2, s'autophosphoryle et cède son phosphate à RegA. Ces auteurs ont proposé un mécanisme pour expliquer la transduction du signal qui conserve encore des points obscurs **[18]**.

Cette description succincte ne rend compte que de la situation chez *Rhodobacter*, qui est un phototrophe non oxygénique. L'absence de O_2 rend moins utile l'hydrogénase HupSL mais stimule la machinerie assimilatrice de carbone et d'azote. Des solutions diffèrentes existent chez d'autres espèces. Chez certaines bactéries, la synthèse de l'hydrogénase n'est pas régulée par H_2 mais par O_2, et ne se fait qu'en aérobiose ou micro-anaérobiose. Les protéines sensibles à O_2 sont également des régulateurs globaux dont nous retrouverons ultérieurement plusieurs exemples. Le contrôle des hydrogénases fait partie des mesures physiologiques prises par les cellules quand elles passent de l'aérobiose à l'anaérobiose ou vice versa. Mais rappelons-nous que l'hydrogène a un rôle clé dans l'environnement. La suite nous en persuadera aisément.

4.3 - BACTÉRIES ACÉTOGÈNES

L'acide acétique est une entité chimique particulièrement répandue dans l'environnement. Certains organismes en font un sous-produit de leur métabolisme énergétique, d'autres l'utilisent comme substrat de croissance. En milieu privé d'oxygène, les bactéries acétogènes font partie de la première catégorie, les méthanogènes de la seconde. Les acétogènes ont été décrits pour la première fois par WIERENGA en 1940 et les premières études ont été faites sur *Clostridium thermoaceticum*. L'acide acétique est le résultat de transformations qui ont pour but de fournir de l'énergie à la cellule. Il fait le lien entre les produits d'hydrolyse et de fermentation nés des matières animales et végétales d'une part, et la transformation ultime en méthane de l'autre. Les acétogènes s'accommodent fréquemment de conditions très frustes, mais ont l'intérêt de réaliser des biodégradations anaérobies complémentaires de celles qui sont faites sous oxygène. En somme ils occupent une niche importante, voire essentielle, dans le cycle naturel des éléments carbonés.

Les acétogènes sont presque tous strictement anaérobies [3], typiquement présents dans les vases des lacs, les boues d'épuration, les rejets de distillerie et les effluents domestiques. On distingue les formes **homo-acétogènes**, qui ne font que de l'acide acétique, par opposition aux **hétéro-acétogènes**, produisant en même temps d'autres acides (butyrique, caproïque et autres). *Eubacterium limosum* et *Butyribacterium methylotrophicum* en sont des exemples. Le caractère acétogène n'appartient pas à un groupe taxonomique particulier et se rattache aussi bien à des espèces Gram-positives sporulantes appartenant au genre *Clostridium* qu'à des non sporulantes (*Acetobacterium woodii*). On rencontre des formes mésophiles et des espèces thermophiles comme *Clostridium thermoaceticum*, qui se développe à 55-60°C. Certains acétogènes Gram-négatifs sont en même temps des sulfato-réducteurs (*Desulfovibrio barsii*). Les acétogènes stricts vivent en autotrophie sur $CO_2 + H_2$ et font de l'acide acétique avec ces seules ressources. L'emploi du dioxyde de carbone à des fins énergétiques est une dissimilation, par opposition à l'assimilation où le CO_2 est pris comme source de carbone pour les synthèses organiques. D'autres espèces sont hétérotrophes et font leur acide acétique sur un substrat organique. Les mixotrophes utilisent les deux modes. C'est le cas de *C. thermoaceticum :*

$$2\ CO_2 + 4\ H_2\ NADH \longrightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2\ H_2O\ NADH \qquad (\Delta G'° = -310\ kJ\ mole^{-1})$$

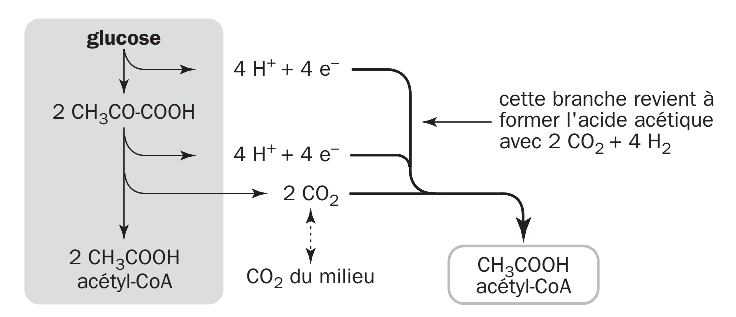
$$C_6H_{12}O_6\ (glucose) \longrightarrow 3\ CH_3COO^- + 3\ H^+ \qquad (\Delta G'° = -95\ kJ\ mole^{-1})$$

Ces deux voies sont productrices d'énergie, la première étant beaucoup plus efficace que la seconde. On voit aisément que la croissance sur glucose, à énergie égale, produit environ 10 fois plus d'acide acétique que la croissance autotrophe symbolisée par la première ligne. L'acide acétique est donc rejeté en abondance pour un rendement énergétique assez médiocre comme dans une fermentation

---

3 - *Ces bactéries n'ont donc rien à voir avec Acetobacter et les germes qui contribuent à transformer le vin en vinaigre, une oxydation aérobie de l'éthanol en acide acétique.*

ordinaire. Une petite partie est néanmoins réutilisée comme source de carbone sans laquelle la cellule ne pourrait effectuer ses synthèses. Au cours de la croissance autotrophe, l'assimilation de CO_2 conduit par conséquent à des synthèses organiques ne passant pas par le mécanisme habituel du cycle de CALVIN utilisé par les plantes vertes et maints organismes autotrophes. C'est là que se manifeste le caractère le plus extraordinaire du métabolisme énergétique des acétogènes. Il est symbolisé par ce petit diagramme indiquant les transformations du glucose.



Acétogénèse sur glucose

Parmi les 3 molécules d'acide acétique formées à partir du glucose, 2 sont issues de l'acide pyruvique grâce à une voie qui n'est autre que la glycolyse bien connue (symbolisée par le rectangle à gauche). Elle produit deux fois 4 électrons, soit 8 au total, et la décarboxylation des 2 molécules d'acide pyruvique libère 2 CO_2. La troisième molécule d'acide acétique correspond à la soudure des 2 CO_2 par la réaction :

$$2\,CO_2 + 8\,e^- + 8\,H^+ \longrightarrow CH_3COOH + 2\,H_2O.$$

L'acide acétique est indiqué ici par souci de simplification, mais le véritable produit est l'acétyl-coenzyme A, dont l'hydrolyse en acétate et coenzyme A libre sera couplée à la formation d'une molécule d'ATP. Cette voie particulière s'appelle la **voie de WOOD-LJUNGDAHL** (voie WL). Elle permet aux bactéries de cette classe de se développer sur CO_2 ou CO comme seule source de carbone. Les détails de cette voie ont été récoltés depuis 1962 et ont donné lieu à un volumineux travail d'analyse **[19]**. La voie WL n'est pas réservée à l'acétogénèse, car elle existe aussi chez les méthanogènes. Elle fonctionne avec l'intervention d'une enzyme exceptionnelle dans la nature, appelée alternativement CO déshydrogénase ou acétyl-coenzyme A synthase que nous retrouverons plus loin (page 211).

Le glucose n'est pas nécessairement la source organique et certaines espèces utilisent le méthanol, le formiate et même le monoxyde de carbone. Par exemple *Eubacterium limosum* utilise le méthanol à la fois pour faire son acide acétique (dissimilation) et comme source de carbone (assimilation). C'est donc un méthylotrophe. L'hydrogène est une excellente source d'électrons pour commuer le gaz carbonique en acide acétique grâce à son bas potentiel standard (– 430 mV à pH 7), mais n'est pas le donneur obligatoire de l'acétogénèse sur CO_2. D'autres sources d'électrons sont employées pourvu que leur potentiel soit suffisamment bas. En outre presque tous les homoacétogènes transforment en acide acétique

des hexoses, des pentoses, des polyols, des acides uroniques, des acides aminés, divers métabolites comme le malate et le lactate. Les acétogènes occupent donc un créneau important dans les transformations de l'environnement. Ils s'emparent des produits déjà dégradés par les hydrolyses et oxydations faites en amont à partir des matières organiques animales ou végétales et transforment tout cela en acide acétique. Celui-ci sera repris à son tour par les méthanogènes pour faire du méthane.

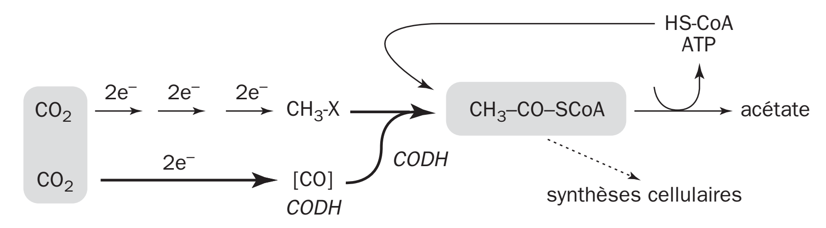
Le monoxyde de carbone rendu célèbre par sa toxicité pour les humains est un produit biologique. Le degré d'oxydation du carbone y est équivalent à celui de l'acide formique. Il y a deux façons d'utiliser le CO dans la nature. La première est une oxydation aérobie en dioxyde de carbone par les bactéries dites carboxydotrophes. Elle est parallèle à la transformation du formiate en CO_2 par la formiate déshydrogénase. La seconde méthode est celle des acétogènes et se fait en anaérobiose, par la réaction globale :

$$4\,CO + 2\,H_2O \longrightarrow CH_3COOH + 2\,CO_2$$

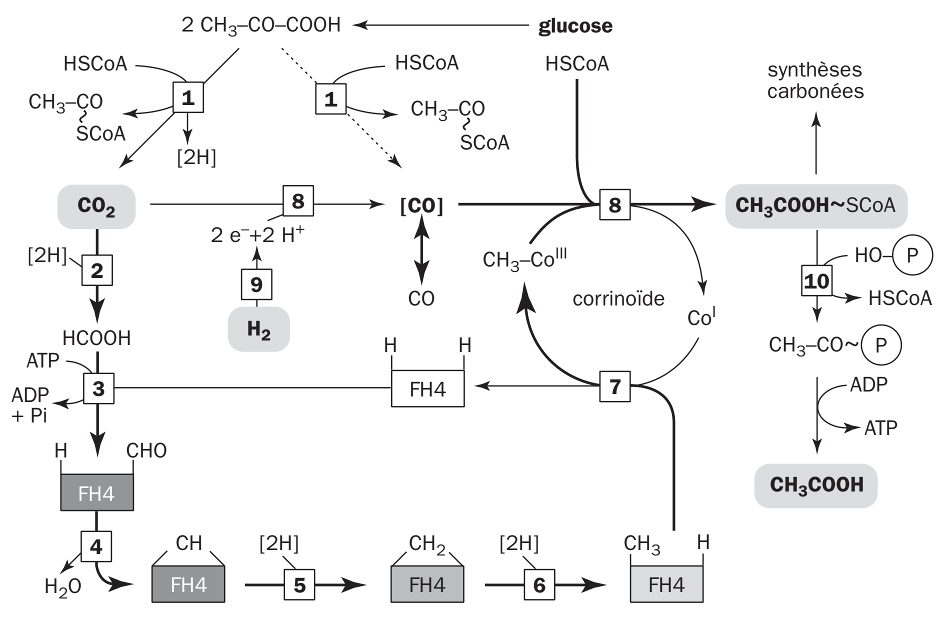
Ainsi *Peptostreptococcus productus* est capable de croître sur monoxyde de carbone comme seule source de carbone et d'énergie **[20]**. Deux molécules de CO parmi les quatre sont oxydées en 2 CO_2. Les 4 électrons fournis servent à réduire un troisième CO en radical méthyle, qui sera soudé au quatrième pour donner l'acide acétique (acétyl-CoA). Ces bactéries sont ubiquistes dans les milieux non marins privés d'oxyène. Leur isolement exige un milieu rendu suffisamment réducteur à l'aide de citrate de titane(III). On a eu la surprise de constater que les acétogènes n'étaient pas strictement anaérobies car ils pouvaient être isolés d'environnements privés incomplètement d'O_2, soit dans des sols bien drainés ou dans le tube digestif de certains insectes. Leur tolérance à l'oxygène peut s'élever à des concentrations atteignant 5% de celle de l'air ambiant. L'oxygène à faible concentration provoque un retard de multiplication mais n'empêche pas toute synthése d'acétate. Il y a mieux. Certains acétogènes colonisent les racines de plantes marines, avec lesquelles ils contractent une association physiologique **[21]**. Or les racines émettent de l'oxygène, et les bactéries y sont donc périodiquement exposées. *Clostridium glycolicum* est adapté à cette situation et dévie son métabolisme en fonction de la présence d'O_2. Ces germes ont les moyens de résister ou de se débarrasser de l'oxygène. Dépourvus de catalase et de superoxyde dismutase, ils ont une NADH oxydase et une peroxydase très actives qui expliqueraient cette résistance **[22]**. Les sédiments marins profonds hébergent une prolifération d'acétogènes. Des expériences de laboratoire suggèrent que la chaleur géothermique à grande profondeur dans les sédiments stimule l'acétogenèse **[23]**. Les acides gras à courte chaîne sont des intermédiaires de la dégradation de la matière organique qui aboutit à l'acétate, et ce dernier est consommé en partie par les méthanogènes.

Les acétogènes, comme les méthanogènes que nous examinerons plus loin, font l'acétyl-coenzyme A par un procédé qui ne ressemble en rien à ce que font la plupart des organismes. Le principe de base est fondé sur l'établissement d'une liaison carbone-carbone à partir de deux molécules de CO_2. L'une de ces molécules est réduite trois fois de suite jusqu'au stade méthyle (X étant un accepteur).

La seconde n'est réduite qu'une seule fois en CO. La **CO déshydrogénase** (CODH) est l'enzyme clé : elle réduit CO_2 en monoxyde de carbone, et fait la soudure pour aboutir à l'acétyl-CoA selon les deux étapes indiquées en trait épaissi. C'est donc aussi une **acétyl-CoA synthase** [4].



Les réductions successives du dioxyde de carbone sont indépendantes de la CODH et mettent en œuvre un cofacteur très important, l'acide tétrahydrofolique ou **FH4**, connu en biochimie classique comme transporteur d'unités mono-carbonées aux trois niveaux d'oxydation : formiate, formaldéhyde, méthanol. Le passage d'un niveau à l'autre s'effectue sur le *cofacteur**.



N°	Terminologie	N°	Terminologie
1	Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase	**6**	5,10-Méthylène-FH_4 réductase
2	Formiate déshydrogénase	**7**	Méthyl-transférase (CFeSP)
3	10-Formyl-FH_4 synthétase	**8**	Monoxyde de carbone déshydrogénase (CODH)
4	5,10-Méthényl-FH_4 cyclohydrolase	**9**	Hydrogénase
5	5,10-Méthényl-FH_4 déshydrogénase	**10**	Acétyl transférase

Voie de WOOD

4 - Le symbole [CO] signifie que le monoxyde de carbone formé reste associé à l'enzyme.

Pour simplifier, les différentes étapes n'ont été figurées que dans un seul sens, bien qu'elles soient réversibles. Voici quelques indications sur les étapes numérotées :

1 - Le pyruvate provient du glucose par la voie glycolytique dite EMP. Sa décarboxylation du pyruvate avec oxydation donne CO_2 ou CO, et produit de l'acétyl-coenzyme A. Dans le métabolisme aérobie classique, la décarboxylation avec oxydation du pyruvate utilise comme accepteur de la paire d'électrons une flavine (FAD). Chez les anaérobies vivant à bas potentiel redox comme les acétogènes, la décarboxylase est une enzyme fer-soufre et l'accepteur est une ferrédoxine, qui décharge les électrons sur une hydrogénase formant H_2. La réaction est exceptionnelle ici parce que l'enzyme peut libérer elle-même de l'hydrogène et fonctionner directement comme hydrogénase sans suivre la procédure habituelle **[24]**. La voie figurée en pointillé est hypothétique. Une autre particularité est le fonctionnement réversible en pyruvate oxydoréductase, pouvant oxyder H_2 en protons et faire du pyruvate. La décarboxylase est donc une **pyruvate synthase**, que *Clostridium thermoaceticum* utilise pour croître sur CO_2 ou CO **[25]**. Les bactéries peuvent donc assimiler CO_2 simultanément par deux voies, selon que l'enzyme utilisée est une pyruvate synthase ou une CO déshydrogénase.

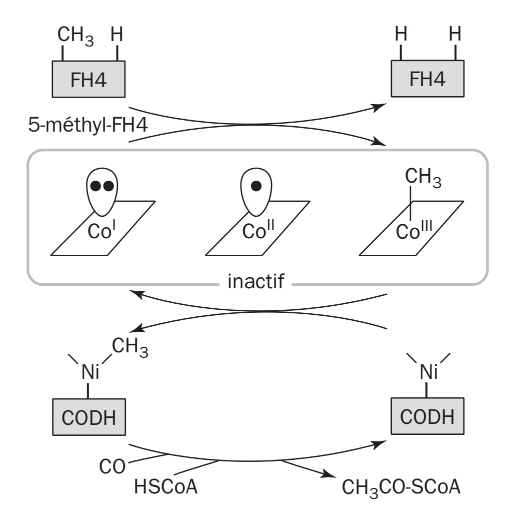
2, 3 - Les ***formiate déshydrogénases**** sont des enzymes répandues dans le monde bactérien. Elles fonctionnent ici dans le sens de la réduction de CO_2 en formiate par NADPH. Le partenaire accepteur ou donneur d'électrons est différent selon les cas. *C. thermoaceticum*. Les formiate déshydrogénases sont typiquement des enzymes à noyau fer-soufre et à sélénium. La soudure de l'élément mono-carboné sur le tétrahydrofolate (**FH4**) comme accepteur s'effectue sans oxydoréduction mais avec un apport d'énergie ATP. La liaison est à haut potentiel et facilite le transfert de l'élément mono-carboné sur d'autres accepteurs.

4, 5, 6 - La déshydratation et les deux réductions successives procèdent d'un métabolisme classique en biochimie. Le méthylène-FH4, qui est au niveau d'oxydation du formaldéhyde, est un intermédiaire essentiel du métabolisme, car il correspond à une entrée majeure des unités mono-carbonées dans les synthèses cellulaires.

7 - Le groupe méthyle est transféré sur une protéine porteuse d'un cofacteur corrinoïde ou CFeSP (*corrinoid-iron-sulfur protein*). On l'a appelé parfois protéine B12. Les ***corrinoïdes****, dont il existe une multiplicité (notamment chez les méthanogènes), sont des outils biologiques tout à fait remarquables, car ils établissent une liaison directe entre un élément carboné et un métal, qui est le **cobalt**. Des indications sommaires sont données en glossaire. Le métal occupe trois niveaux d'oxydation : Co^{1+}, Co^{2+} et Co^{3+} ou Co(I), Co(II) et Co(III). La méthylation du cobalt n'est possible qu'au niveau Co^{1+}. Son oxydation au niveau Co^{3+} fragilise la liaison et facilite le transfert sur un accepteur. Il y a donc sur le cobalt un cycle d'oxydo-réduction interne avec canalisation des électrons par noyau fer-soufre **[26]**.

Le groupe méthyle est transmis du FH4 (en haut) à la CODH ou acétyl-CoA synthase (en bas), par le corrinoïde de la méthyl-transférase (cadre central). Au cours du premier transfert, le cobalt passe de l'état I à l'état III, puis revient de III à I au cours du deuxième transfert.

Une oxydation spontanée de Co(I) à Co(II) conduit à l'inactivation du système, mais le retour à l'état Co(I) actif est possible *in vivo* à l'aide d'une ferrédoxine réduite, ou *in vitro* par des agents réducteurs puissants, car le potentiel redox du couple Co(II)/Co(I) est très bas, soit E'° = – 502 mV. On a découvert que le site accepteur de méthyle sur la CODH contient du **nickel**.



Selon cette interprétation **[27]**, le passage Co(I)-Co(II) ne fait pas partie du cycle catalytique de l'enzyme. Le mécanisme de la transférase ne comporterait que l'alternance entre les états Co(I) et Co(III), en mettant à contribution un noyau fer-soufre du type [4Fe-4S] servant alternativement de donneur et d'accepteur interne, en même temps qu'un autre site non identifié. La structure de la méthyl-transférase comporte deux sous-unités de 33 et 55 kDa. La première contient la cobalamine et lie le méthyl-FH4, tandis que la seconde renferme le noyau fer-soufre. La structure détaillée de la première partie chez *C. thermoaceticum* a été déterminée à 2,2 Å de résolution **[28]** et montre une structure en tonneau où s'insèrent côte à côte FH4 et cobamide.

Cette méthyl-transférase joue avec une liaison directe entre un métal et un atome de carbone, un processus très rare en biologie. Le procédé utilisé par la protéine s'interprète comme un renforcement de la réactivité du méthyle porté par le FH4 quand celui-ci vient se fixer. Voici un petit schéma hypothétique **[29]**. La protonation du donneur déclenche une réaction de substitution avec changement de conformation de l'enzyme et concession d'un électron par le noyau [4Fe-4S]. En même temps le méthyle prend un caractère électrophile et attaque le métal comme le ferait un carbocation.

Attaque électrophile sur le cobalt

Imaginons que cette opération soit entièrement réversible. En remplaçant le FH4 par un accepteur qui ne sera autre que la CODH, le méthyle quitterait un métal pour aller vers un autre métal qui serait le nickel, tandis que le noyau [4Fe-4S] restituerait l'électron qu'il a reçu.

8, 9 - L'étape fondamentale de la voie de WOOD-LJUNGDAHL consiste à assembler le méthyle, le monoxyde de carbone et le coenzyme A (HSCoA). Quand CO_2 remplace CO, une réduction fait intervenir l'hydrogène comme le donneur initial d'une paire d'électrons, acheminés par hydrogénase et ferrédoxine. L'enzyme qui fait l'assemblage général est comme on le sait à la fois une CO déshydrogénase et une **acétyl-CoA synthase** que nous continuerons à désigner en abrégé CODH. Cette enzyme extraordinaire n'a pas d'autre équivalent dans le monde vivant et se retrouvera aussi comme pièce maîtresse des méthanogènes. L'étape **9**, qui est la réaction d'une hydrogénase, serait catalysée par la CODH elle-même [5]. En somme l'enzyme serait capable de se passer d'une hydrogénase séparée et d'utiliser elle-même H_2, ce qui lui ferait catalyser trois réactions réversibles : l'oxydoréduction CO_2/CO, l'oxydoréduction $2H^+/H_2$, la synthèse ou la rupture de l'acétyl-CoA ! La conséquence est un pouvoir d'adaptation remarquable. *Clostridium thermoaceticum* peut se développer sur monoxyde de carbone, faire son CO_2 et de l'hydrogène, fabriquer de l'acétyl-CoA pour son métabolisme et faire aussi du pyruvate ! La CODH a des caractères similaires chez les acétogènes et les méthanogènes. Chez *C. thermoaceticum*, la CODH est un tétramère de structure $\alpha_2\beta_2$. Il y a trois noyaux contenant du fer et du soufre, appelés A, B et C. L'enzyme est codée par un opéron contenant les gènes *acsA* et *acsB* (les sous-unités β et α), *acsC*, *acsD* (la protéine à corrinoïde) et *acsE* (la méthyl-transférase). Voici les caractères des sous-unités de la CODH :

Sous-unité α - 81 kDa. Un noyau [4Fe-4S] ou centre **A**, associé à du nickel et du cuivre. C'est là que se fait l'assemblage de l'acétyl-CoA, le CO étant porté par du **cuivre** et le méthyle accepté par le nickel.

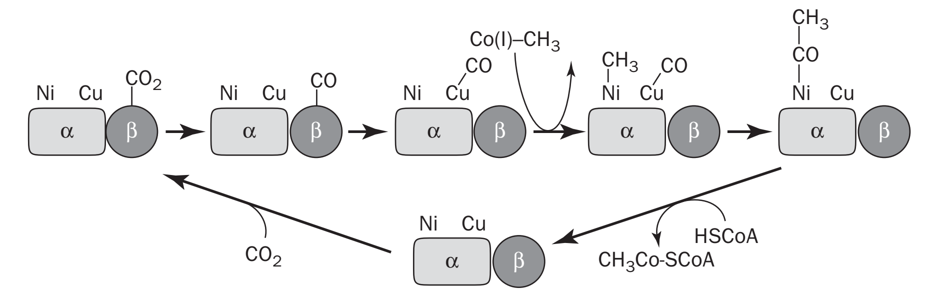
Sous-unité β - 72 kDa. Il y a deux noyaux fer-soufre, les centres **B** et **C**. Cette partie est consacrée à l'oxydoréduction CO_2/CO qui a lieu sur le site C, un [4Fe-4S] modifié de structure encore incertaine et lié à du **nickel** fermement lié. Un [4Fe-4S] canalise les électrons échangés par B.

Très schématiquement : la partie α est l'acétyl-CoA synthase, par l'apport de CO (provenant des sous-unités β) et de groupes méthyle (provenant de la transméthylase à cobalt). La partie β est la CO déshydrogénase proprement dite. C'est sans doute elle qui fonctionne aussi comme hydrogénase. Elle figure seule dans la CO déshydrogénase de certaines espèces bactériennes, qui ne font pas l'acétyl-CoA comme le phototrophe *Rhodospirillum rubrum* **[30]**.

L'hypothèse du groupe de RAGSDALE est fondée sur l'emploi des spectrométries RPE et RAMAN, ainsi que des isotopes du fer, du nickel et du carbone (^{54}Fe, ^{64}Ni, ^{13}C) **[31]**. Le déplacement des raies de résonance des liaisons carbone-métal permet de se faire une idée de l'entité qui reçoit CO ou CO_2. La réduction du CO_2

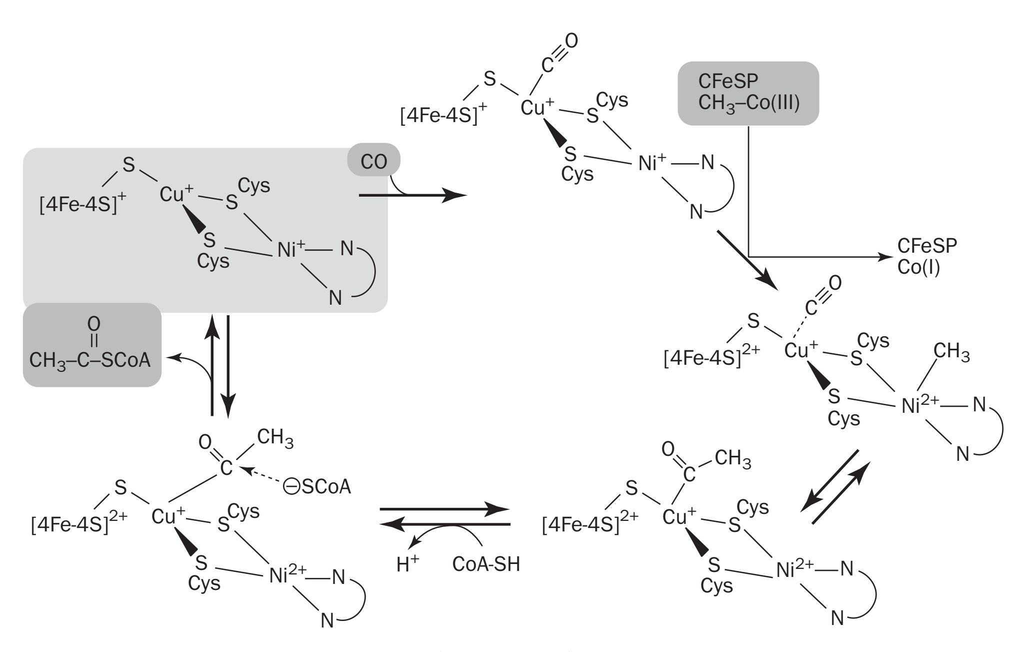
5 - *Montré par MENON et RAGSDALE (1996) cités plus haut, comme pour la pyruvate oxydoréductase.*

s'effectue sur la partie β de la CODH. Le CO formé comme intermédiaire dans la synthèse de l'acétyl-CoA gagnerait alors un noyau fer-soufre-nickel. Celui-ci se trouve sur un site appelé A dans la partie α. Le passage se ferait par un "tunnel", une voie de communication interne entre les deux sous-unités, empêchant tout échange avec l'extérieur. D'après un article récent de SERAVALLI **[32]** , l'accepteur de CO sur le site A serait le cuivre, tandis que le groupe méthyle acheminé par la transférase serait déposé sur le nickel dans une étape considérée comme limitante **[33]**. Le schéma suivant est une interprétation encore provisoire montrant la synergie entre une partie synthétase (α) et une partie CO déshydrogénase (β). Le coenzyme A serait stocké sur un site voisin du noyau fer-soufre-nickel.



Synthèse de l'acétyl-CoA

Une structure détaillée de la CODH a été récemment publiée par DARNAULT et collaborateurs **[34]**. Le mécanisme réactionnel a été proposé par SERAVALLI et le groupe de RAGSDALE. Il est montré ici à titre indicatif car le rôle du cuivre reste controversé.



Synthèse de l'acétyl Co-A

Dans la structure cristallographique publiée par DARGAULT et collaborateurs, deux compositions différentes des sites actifs ont été identifiées : zinc-nickel-fer pour une des sous-unités en conformation fermée, et nickel-nickel-fer pour l'autre sous-unité en conformation ouverte. Ces auteurs pensent que l'hétérogénéité vient des conditions expérimentales. Les métaux cités sont exposés au solvant et sont probablement facilement échangeables. Il est possible que la paire Ni-Ni soit le pôle essentiel, l'un des nickel étant plus labile et remplacé par du cuivre et même du zinc. Tous les résultats expérimentaux convergent vers le caractère indispensable du nickel, alors que le rôle du cuivre reste problématique. Il a été possible récemment de faire exprimer par *Escherichia coli* la CODH complète de *C. thermoaceticum*. Ces bactéries se sont montrées assez complaisantes pour faire une CODH active après insertion du nickel **[35]**.

10 - La dernière étape est classique chez les bactéries de la fermentation. L'acétyl-phosphate a un potentiel énergétique comparable à celui de l'acétyl-CoA. Il y a formation d'ATP. Le principe de la voie de WOOD-LJUNGDAHL, décrite ici chez les acétogènes, est adopté aussi par les méthanogènes, mais nous trouverons d'importantes différences au niveau des cofacteurs et une physiologie particulière.

4.4 - LA GENÈSE DU MÉTHANE

Nous savons qu'il existe un cycle du méthane dans l'environnement. Il est temps maintenant de préciser comment se forme le méthane dont nous savons qu'il peut être un maillon important des biotransformations. Le méthane d'origine biologique présente un déficit caractéristique en carbone-13. La mesure du rapport $^{13}C/^{12}C$ dans le gaz naturel, qui est riche en méthane, a permis de montrer qu'il est en grande partie d'origine biologique fossile. La **méthanisation** peut-elle intervenir dans le nettoyage de notre environnement ? La réponse est affirmative pour deux raisons. La première se rapporte à l'activité réductrice des méthanogènes eux-mêmes. Divers substrats peuvent y être réduits au même titre que le CO_2. C'est pourquoi la méthanogénèse peut s'accompagner de la transformation d'une variété de substances. La deuxième raison découle de l'association des méthanogènes dans les populations mixtes qu'ils contribuent à stabiliser. En effet ils débarrassent leurs partenaires de certains produits nés de leur activité, comme le gaz carbonique, l'hydrogène, les acides formique et acétique. Sans la méthanogénèse, l'accumulation de ces produits entraverait rapidement le développement de la microflore. Les méthanogènes sont en somme les éboueurs de ces populations anaérobies. Le méthane en est le principal déchet non réutilisable sur place, car son métabolisme nécessite de l'oxygène. La méthanisation enlève les déchets. Une biodégradation totale ou partielle de polluants organo-halogénés, par exemple, peut s'établir ainsi en anaérobiose au sein de ces associations. Elle élimine alors l'halogène sous forme d'anions inoffensifs (chlorure, bromure ou iodure) tout en libérant des molécules carbonées plus facilement métabolisables. Les méthanogènes sont abondants dans tous les sédiments anoxiques, fonds de lacs, mangroves, marécages, fonds marins.

La méthanogénèse n'existe que chez les archaebactéries et correspond à un processus générateur d'énergie qui s'empare des produits abondants engendrés par d'autres organismes. L'acide acétique des fermentations ou des acétogènes est l'un d'eux. La méthanogénèse dite **acétoclastique** utilise l'acide acétique selon un bilan très simple :

$$CH_3\text{–}COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2$$

Il correspond à une part importante du méthane produit dans la nature en recyclant cet acide acétique qui sans cela s'accumulerait en abondance en milieu anaérobie. Un autre mode de synthèse du méthane est la réduction du gaz carbonique par l'hydrogène :

$$CO_2 + 4\,H_2 \longrightarrow CH_4 + 2\,H_2O$$

De façon générale la production de CH_4 est réalisée dans un milieu très réducteur où les méthanogènes sont associés la plupart du temps à d'autres micro-organismes au sein de populations mixtes souvent complexes.

La méthanogénèse est le premier volet du cycle du méthane qui sera complété par les oxydations en dioxyde de carbone pratiquées par les organismes aérobies méthanotrophes. Une partie du CH_4 échappe à cette destruction en diffusant dans l'atmosphère. Cette "évaporation" est facilitée par les plantes. On estime par exemple que les plants de riz canalisent plus de 90 pour cent du méthane produit à leur pied, le reste étant en partie émis par la montée du gaz à la surface de la rizière [6]. Le méthane du sol est en partie capté par les racines avant d'être véhiculé vers le feuillage, qui en assure la dissémination dans l'air ambiant. On a découvert que le fond des mers recèle des quantités énormes de méthane sous forme d'**hydrate**. Il se présente sous forme d'une glace grisâtre, instable et inflammable. Chimiquement, c'est un clathrate où les molécules de méthane sont entourées d'une cage rigide de molécules d'eau associées par des ponts hydrogène. La quantité de méthane ainsi immobilisée dépend de la géométrie du clathrate. Le rapport moyen CH_4/H_2O est 5,75. La fusion de l'hydrate libère 164 fois son volume de méthane gazeux. Où trouve-t-on cet hydrate ? Les conditions typiques nécessaires existent en bordure du plateau continental en eau très froide (0°C) et sous forte pression (plus de 3 MPa, soit à 200-450 m de profondeur). L'hydrate est instable à moins de 190 m, mais il se concentre sous la surface des sédiments jusqu'à une épaisseur de 1000 m au moins. Sa présence se traduit par un écho particulier au cours des prospections sismiques. On en a trouvé un peu partout dans le monde [7]. Le méthane est un gaz mobile, qui peut voyager dans les sédiments, diffuser dans des roches poreuses, rester bloqué par des couches sédimentaires imperméables. La formation de l'hydrate est donc probablement réalisée en conditions physiques favorables quand les teneurs en méthane et en eau sont suffisantes. L'hydrate de

6 - *Des gaz autres que le méthane tels que le phosphure d'hydrogène sont spontanément inflammables, et engendrent les fameux feux follets.*

7 - *Peu le long de nos côtes mais surtout en zones arctiques et antarctiques, le long des côtes américaines, au large du Japon, dans les zones continentales où il y a un permafrost (Sibérie). Ailleurs en Caspienne, Mer Noire, Golfe du Mexique, au large du Pérou.*

méthane a été regardé longtemps comme une curiosité, un phénomène parasite qui pouvait bloquer les gasoducs dans les régions froides. La situation s'est inversée. On le voit comme une source d'énergie potentielle, particulièrement au Japon où sont menées des recherches très actives. Selon les estimations les plus pessimistes, le méthane mondial immobilisé sous cette forme représenterait plus de mille milliards de tonnes. Encore faudrait-il pouvoir l'exploiter. L'hydrate de méthane, en se décomposant brusquement, peut faire naître un grand volume de gaz et provoquer des accidents au moment des forages. Pour l'étudier, il a donc fallu le remonter avec précaution sous pressurisation. D'autre part on craint que toute cause comme le réchauffement climatique puisse faciliter le départ de ce méthane vers l'atmosphère et renforcer l'effet de serre. Il y aurait alors un phénomène d'amplification, renforcement de l'effet de serre, réchauffement, libération de davantage de méthane, et ainsi de suite.

D'où vient tout ce méthane ? Il a été tenté de répondre à cette question par des mesures isotopiques en *IRMS**. L'étude d'un hydrate provenant de la côte nord de l'Alaska donne une réponse mitigée. La méthanogénèse biologique serait responsable de 30 à 40% du gaz étudié, le reste étant considéré comme d'origine thermogène, provenant des couches profondes de l'écorce et accompagné de petites quantités d'éthane et de propane. Le problème rejoint celui de l'origine du pétrole, dont le méthane est finalement le composant le plus simple. Deux thèses s'affrontent. Soit les hydrocarbures sont considérés comme d'origine essentiellement tellurique, soit ils sont au contraire d'origine biologique. Les tenants de l'origine tellurique des hydrocarbures, comme Thomas GOLD **[36]**, font remarquer que le carbone est le quatrième élément en abondance dans l'univers (après H, He et O), et que le méthane est abondant dans le système solaire. L'appauvrissement du méthane en carbone-13 ne serait pas causé nécessairement par un effet biologique, mais par un fractionnement physique au cours de la migration du gaz. Pour les tenants de l'origine biologique au contraire, les êtres vivants seraient la source principale. La question est encore loin d'être tranchée, mais une double origine pour le méthane et les hydrocarbures reste tout à fait possible.

Peut-on évaluer l'importance des rejets par les bactéries méthanogènes ? Les estimations ne sont forcément que des ordres de grandeur. Les mesures faites en des endroits différents donnent souvent des résultats contradictoires. La quantité totale de CH_4 libéré dans la biosphère dépasserait 550 millions de tonnes par an. Le méthane produit sans intervention humaine n'en représenterait qu'un tiers. Il s'agit du gaz des marais et des sols (50 à 150 millions de tonnes), des émanations de gaz naturel et du méthane produit par les bactéries intestinales de nombreuses espèces animales : termites, coléoptères variés et autres arthropodes, ainsi que des mammifères ruminants sauvages. Pour certains auteurs, les émissions totales de méthane à partir des insectes des pays chauds comme les termites apporteraient une contribution non négligeable au méthane atmosphérique **[37]**. La part prépondérante depuis plusieurs décennies serait anthropogénique : industrie minière (charbon, pétrole, fuites des installations de gaz naturel), culture du riz, épandage de déchets, élevage intensif des ruminants. Le tout pour au moins 200 à 350 millions de tonnes par an dont la plus grande part revient à l'hémisphère nord. La seule culture du riz qui ne cesse de se développer contribuerait pour plus de

60 millions de tonnes par an. Si on admet que la planète comptera plus de 8 milliards d'êtres humains en 2020, la production de riz devrait augmenter de 50 à 70%. Or le riz est la base de l'alimentation de plus de la moitié des habitants de la terre. En 1995, sa production était déjà supérieure à celle du blé, à raison de 550 millions de tonnes de riz non décortiqué (ou paddy). Grâce à l'emploi de variétés nouvelles, le rendement peut atteindre 150 quintaux à l'hectare (davantage que pour le blé), et les efforts actuels tendent à l'améliorer fortement. Malgré la sélection de nouvelles variétés, la culture du riz reste dépendante de ressources considérables en eau et crée des conditions très favorables à la méthanisation. Pourquoi ? Sans doute parce que les rizières comme tous les terrains inondés, au moins temporairement, sont riches en matières organiques et rapidement appauvris en oxygène. Les fermentations et la production de CO_2, d'hydrogène et d'acide acétique sont favorables à la production du méthane. Les racines des plantes sécrètent pourtant un peu d'oxygène utile aux organismes de la rhizosphère, et il ne devrait pas y avoir de méthanogénèse à leur contact. Ce n'est pas le cas.

Des auteurs ont montré que les racines du riz sont truffées de méthanogènes, dont la survie semble pouvoir s'accommoder d'une exposition temporaire à O_2. La biologie des méthanogènes dans les terrains anoxiques inondés met en évidence des espèces nouvelles et une complexité imprévue **[38]**. La détection des méthanogènes dans un biotope donné, outre les méthodes d'isolement classique, fait appel à la mise en évidence chromatographique des lipides di-éthers caractéristiques des archaebactéries et à la recherche d'ARN ribosomique spécifique.

Une autre source de méthane est directement liée à la population humaine, car elle correspond à la dégradation des déchets industriels ou urbains dans les décharges et terrains d'épandage. La législation française a prévu d'interdire toutes les décharges depuis 2002 (avec des entorses ici et là !). L'idéal est évidemment d'obtenir l'élimination des déchets en récupérant le méthane produit, celui-ci étant brûlé ensuite comme source d'énergie. Cette opération est conduite ici ou là dans des usines spécialisées ou dans des installations domestiques à petite échelle (Biogaz). Malheureusement la méthanisation des déchets est souvent lente et nécessite sur le plan industriel des investissements très importants, qui sont en concurrence avec les sources de gaz naturel. Plus de 50 millions de tonnes de CH_4 par an seraient émis dans l'atmosphère à partir de nos déchets, assez pour qu'on s'en préoccupe !

Les océans sont également le siège d'une méthanogénèse, et un équilibre s'établit entre le méthane dissous et celui de l'atmosphère. Certaines mers sont plus riches en méthane que d'autres. C'est le cas notamment de la Mer Noire. Elle contiendrait à elle seule 96 millions de tonnes de CH_4, lequel se concentrerait à plus de 100 m de profondeur, où sa teneur atteindrait 11 mM. La Mer Noire est une mer quasi fermée dont le taux de pollution par les nombreux pays riverains devient particulièrement alarmant. Le développement excessif des strates profondes privées d'oxygène retarde la dépollution et provoque une disparition massive d'une partie de la faune aquatique **[39]**. Dans les lacs et étangs, la méthanogénèse est souvent très active à certaines périodes de l'année, parce que les eaux de surface, réchauffées par le soleil et oxygénées au contact de l'atmosphère, forment une

zone isolante au-dessus des eaux profondes plus froides et donc plus denses, séparées par la zone de transition appelée thermocline. Celle-ci peut se former à 10-20 m de profondeur dans les lacs en été. Les eaux profondes perdent alors plus rapidement leur oxygène, reçoivent des matières organiques coulant à partir de la surface, et deviennent propices à la formation et au stockage du méthane. La stratification des eaux favorise donc la création de réservoirs anoxiques de gaz dissous.

La production de méthane atteint son plus haut degré de sophistication dans le **rumen**, milieu complexe établi dans la panse des ruminants (bovins, moutons, chèvres, chameaux, girafes, cervidés...) avant que les végétaux broutés et mastiqués parviennent à l'estomac proprement dit. Le rumen est une formidable usine à transformer la matière végétale, où se développent dans une ambiance anaérobie et sous brassage à température constante une grande quantité de micro-organismes variés. Les ruminants produisent une masse importante de salive (plus de 100 L par jour pour une vache adulte), qui apporte de l'eau et du bicarbonate. Elle aide à maintenir le pH du rumen. L'hydrolyse bactérienne de la cellulose libère du cellobiose et du glucose, d'excellents substrats soumis à d'intenses fermentations productrices d'acides organiques, acétique, butyrique et propionique, ou encore des acides gras. Ces acides fournissent de 40 à 70% des ressources énergétiques de l'animal. L'acide propionique est l'un des facteurs importants. Une microflore complexe comprend des eubactéries, des protozoaires et des champignons. Les méthanogènes tels que les *Methanosarcina* transforment en méthane divers composés issus de l'activité des autres espèces. L'acide acétique est l'un de ces produits. Tout ce peuplement risquerait de se trouver à cours d'azote si l'animal ne fournissait de l'urée, qui diffuse à travers la muqueuse digestive à partir du sang et se transforme en CO_2 et ammoniac par l'uréase microbienne.

Après avoir été profondément brassée et dégradée dans le rumen, la matière végétale est transmise à l'estomac proprement dit. Il s'y fabrique de grandes quantités de **lysozyme**. On sait que cette enzyme, qui existe communément dans les sécrétions animales (larmes, salive, blanc d'œuf...) hydrolyse des composés particuliers de la paroi bactérienne, appelés peptidoglycanes. Le lysozyme est donc une enzyme antibactérienne qui facilite ici la digestion de nombreuses bactéries lorsque celles-ci ont fini leur travail [8]. Chose intéressante, les ruminants ont développé au cours de l'évolution des lysozymes modifiés plus actifs en milieu acide et plus résistants à l'action de la pepsine que les lysozymes courants comme celui qu'on trouve chez l'homme dans les sécrétions lacrymales. Moyennant quoi l'apport des animaux d'élevage dans le cycle du méthane est donc loin d'être négligeable. La quantité de gaz émise par une vache adulte peut s'élever à 30-50 litres par heure, contre 5 litres pour moutons et chèvres dans le même temps. Ce sont finalement 65 à 100 millions de tonnes de méthane qui sont émises dans l'atmosphère chaque année par les fermentations digestives des animaux sauvages et domestiques. Comme les activités pastorales augmentent en même temps que la

---

8 - *C'est une simple approximation, parce que le lysozyme n'attaque pas la paroi de toutes les bactéries ; les archaebactéries et eubactéries qui ont une paroi modifiée ou une couche S résistent.*

population mondiale, leur part dans le cycle du méthane ne devrait pas diminuer, bien au contraire.

Cette intense activité méthanogène ne fait pas que participer à un cycle biologique très important, elle obéit à une biochimie très particulière. Voici en résumé les caractéristiques essentielles de la méthanogénèse.

- Le méthane est produit en conditions strictement anaérobies par des archaebactéries à l'exclusion de toute autre catégorie d'organismes. C'est le stade ultime d'une chaîne de transformations des matières organiques, commencées en présence d'oxygène, poursuivie en anaérobiose plus ou moins complète par les fermentations, la dénitrification ou d'autres respirations anaérobies, et par l'acétogénèse. Le méthane produit par voie biologique se reconnaît par son déficit en carbone-13 qui correspond à un *fractionnement isotopique**, l'un des plus importants parmi les processus biologiques. L'abondance naturelle de l'isotope 13 du carbone par rapport au carbone-12 peut diminuer de 5% et plus dans le méthane.
- Les compétiteurs naturels des méthanogènes sont les bactéries sulfato-réductrices, car leur activité détourne l'hydrogène et tend à freiner l'apparition du méthane là où le sulfate est abondant (notamment en milieu marin). En outre le sulfure dégagé inhibe le développement des méthanogènes.
- L'énergie de la méthanogénèse est directement couplée à un transport de protons ou d'ions sodium vers l'extérieur, c'est-à-dire à l'établissement d'un potentiel membranaire. Elle s'apparente donc à une respiration. Comme l'énergie récupérée est relativement faible, les méthanogènes sont contraints de transformer une grande quantité de source carbonée et tendent à s'associer avec d'autres espèces microbiennes complémentaires par leur l'activité. La méthanogénèse est donc souvent une affaire de syntrophisme dans des communautés cellulaires dotées d'un métabolisme global complexe. Ces associations sont actives en particulier dans le floc des stations d'épuration et des formations particulières appelées granules. Il en résulte des biodégradations performantes libérant du méthane comme un des stades ultimes.
- La formation du méthane obéit à une mécanique particulière fondée sur l'emploi de coenzymes inédits. Les génomes de *Methanococcus jannaschii* et *Methanobacterium thermoaceticum* **[40]** ont été entièrement séquencés et apportent une mine de données pour répertorier et comparer tous les éléments de la biochimie très particulière de ces organismes.

4.5 - LES ÉTAPES DE LA MÉTHANOGENÈSE

Plusieurs voies sont possibles pour engendrer le méthane. Le point de départ est le dioxyde de carbone ou un produit organique simple. En règle générale les matières premières utilisées sont des sous-produits de fermentations au cours de la décomposition de la matière végétale : CO_2, H_2, formiate, acétate, butyrate, méthanol,

éthanol... Le dioxyde de carbone est réduit en méthane en quatre étapes successives avec l'hydrogène comme donneur. La réaction globale est :

$$CO_2 + 4\,H_2 \longrightarrow CH_4 + 2\,H_2O \qquad (\Delta G'° = -\,131\ kJ.mol^{-1})$$

$$CO_2 \xrightarrow{2\,H^+ + 2\,e^-} \underset{\text{acide formique}}{HCOOH} \xrightarrow[H_2O]{2\,H^+ + 2\,e^-} \underset{\text{formaldéhyde}}{HCHO} \xrightarrow{2\,H^+ + 2\,e^-} \underset{\text{méthanol}}{CH_3OH} \xrightarrow[H_2O]{2\,H^+ + 2\,e^-} CH_4$$

Les quatre réductions

Les trois intermédiaires du schéma sont théoriques, car l'élément mono-carboné reste lié à un coenzyme au cours des étapes successives. On voit que l'ensemble du processus est exergonique à l'état standard et à pH 7. La valeur indiquée (– 131 kJ) est une valeur théorique puisque dans les conditions réelles le gaz carbonique et l'hydrogène sont loin de l'état standard. On sait que l'hydrogène ne s'accumule pas dans les milieux naturels, et à une pression de 10 Pa seulement, cette valeur de $\Delta G'°$ est en réalité proche de – 40 kJ. Le CO_2 n'est pas obligatoirement la source du méthane. Le groupe des méthano-sarcinales contient des espèces comme *Methanosarcina mazei*, qui sont capables d'utiliser H_2 et des sources de carbone diversifiées : méthanol, méthylamine, acétate. Leur action s'étend à des composés tels que CCl_4 et le chloroforme, ce qui est utile pour la défense de l'environnement. Ces organismes sont désignés comme les méthanogènes **méthylotrophes** par rapport aux autres qui sont des **hydrogénotrophes**.

L'étape la plus énergétique de la cascade de réductions est la dernière après le passage au niveau méthyle. On peut s'en rendre compte par la transformation du méthanol en méthane, qui représente plus de 80% de l'énergie obtenue à partir de CO_2 à l'état standard :

$$CH_3OH + H_2 \longrightarrow CH_4 + H_2O (\Delta G'° = -\,112\ kJ.mol^{-1})$$

La méthanogénèse est également possible à partir du formiate issu des fermentations, et se fait par une dismutation produisant à la fois CO_2 et CH_4 :

$$4\,HCOO^- + 4\,H^+ \longrightarrow CH_4 + 3\,CO_2 + 2\,H_2O$$

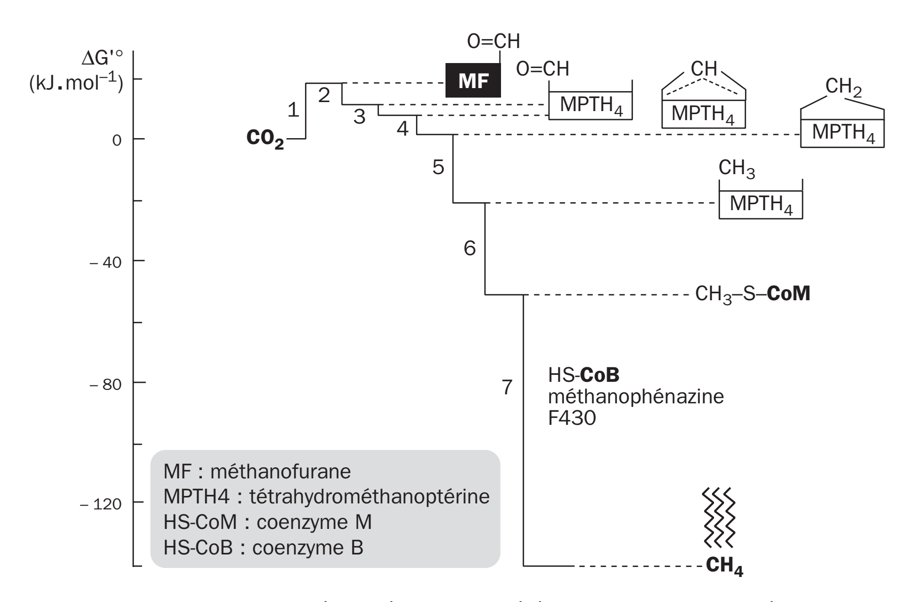
Les méthanogènes sont seuls à réaliser ces transformations énergétiques qui rejettent le méthane comme sous-produit inutile. Comment les cellules récupèrent-elles cette énergie ? En couplant plusieurs étapes à l'établissement d'un potentiel de membrane, établi par translocation de protons et d'ions sodium. La nature de cette opération a été révélée par les expériences de B LAUT et GOTTSCHALK **[41]**. Il s'agit d'un métabolisme de type respiratoire anaérobie, où le substrat oxydé est l'hydrogène, et l'accepteur final le CO_2. La méthanisation peut se faire aussi à partir de l'acide acétique. C'est la **méthanogénèse acétoclastique**, une forme de méthylotrophie car le méthane est produit à partir du groupe méthyle. L'acide acétique est récupéré là encore à partir de l'activité des fermentations et de l'acétogénèse.

$$CH_3\text{–}COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2 (\Delta G'° = -\ kJ.mol^{-1})$$

L'énergie obtenue en partant de l'acide acétique est relativement modeste. Pourtant une part très importante de la méthanogénèse dans la nature se réalise ainsi, et l'acide acétique est parfois la source prédominante du méthane. On peut le comprendre aisément puisque l'acétate est un produit de fermentation abondant, alors que l'hydrogène est un gaz volatil, rapidement oxydé par d'autres voies et généralement présent à taux très faible.

Le mécanisme biochimique de la conversion de CO_2 en méthane n'est connu que depuis une période récente, il est assez compliqué et met en jeu une batterie de cofacteurs qui n'existent nulle part en dehors des méthanogènes (sauf rares exceptions). On en donnera un aperçu condensé. Des revues récentes contiennent beaucoup de renseignements utiles et de longues bibliographies **[42]**.

Un diagramme montre les différentes étapes. L'échelle symbolise les variations d'énergie libre approximatives à l'état standard, et chaque réaction avec son numéro est une marche d'escalier. Le dioxyde de carbone est réduit en même temps qu'il est déchargé sous forme de formyle (O=CH–) sur un coenzyme spécial ressemblant au FH4. L'élément mono-carboné qui lui est lié va subir à nouveau deux réductions. Nous avons déjà rencontré le FH4 (tétrahydrofolate) chez les acétogènes. Le principe est ici le même, le FH4 étant remplacé par le MPTH4 (tétrahydrométhanoptérine). La dernière partie (réactions **6** et **7**) est la plus compliquée et la principale exclusivité des archaebactéries. La plupart des étapes ont besoin d'un bas potentiel d'oxydoréduction, inférieur à – 300 mV, et sont catalysées par des enzymes sensibles à l'oxygène. Les manipulations de laboratoire doivent donc se faire sous atmosphère inerte.



Cheminement énergétique de l'élément monocarboné

Il faut se rappeler que le FH4 ou le MPTH4 ne subissent pas d'oxydoréduction, mais servent de supports pour les interconversions entre formiate et méthanol. Les réactions sont potentiellement réversibles, entre étapes formyl-, méthényl- (après cyclisation catalysée par une cyclo-isomérase), méthylène-, méthyl-. Deux déshydrogénases sont dans ce va-et-vient. Les réactions sont repérées par numéro.

1 - Le CO_2 est réduit en acide formique qui décharge son groupe formyle sur un accepteur appelé **méthanofurane** (MF). Un coenzyme inhabituel, dont voici la structure :

$^{-}$OOC COO^{-} COO^{-} O N H COO^{-} H N O COO^{-} O N H O O NH$_3^+$

O O NH$_3^+$ CO_2 2 H$^+$+ 2 e$^-$ O O NH CHO

L'intermédiaire formé est le **formyl-méthanofurane** (formyl–MF). L'enzyme de structure complexe est une déshydrogénase qui a été purifiée chez *Methanosarcina barkeri* **[43]**. Elle a cinq sous-unités différentes, possède une ribambelle de noyaux fer-soufre et une molybdoptérine. Ce cofacteur est courant dans le nature et nous le retrouverons dans la réduction du nitrate ou du formiate. Il a ici la structure d'un dinucléotide (*MGD**), contient du **molybdène** ou du **tungstène**. On suppose que cette partie a le rôle essentiel dans la catalyse, les électrons étant fournis par une hydrogénase et dirigés vers le site actif par la chaîne de noyaux fer-soufre de type [4Fe-4S]. La formation du formyl-méthanofurane est légèrement endergonique et correspond à la marche énergétique montante en haut du diagramme. La réduction catalysée par une formiate déshydrogénase s'accompagnerait d'un saut en énergie bien plus marqué, et l'intervention du méthanofurane semble une solution pour franchir facilement la petite colline énergétique par un effet de siphon, le formyl-MF étant absorbé en aval au fur et à mesure.

2 - Un transfert du formyle se fait sur le tétrahydrométhanoptérine (MPTH4), pour donner le **N5-formyl-MPTH4**. Il n'y a pas d'oxydoréduction. Le formyle change simplement de véhicule. Le nouvel accepteur ressemble au tétrahydrofolate (FH4) aperçu chez les acétogènes, et servira de support pour les deux réductions suivantes. Sa formule a été simplifiée [9]. Ont été symbolisées les trois combinaisons de l'élément mono-carboné avec le MPTH4, en fonction de son niveau d'oxydoréduction. Des archaebactéries sulfato-réductrices **[44]** et quelques protéobactéries utilisatrices du méthanol **[45]** renferment aussi ce cofacteur. Ont été repérées comme pour le FH4 les deux positions azotées essentielles 5 et 10. L'enzyme responsable de cette étape a été purifiée **[46]** et sa structure détaillée est connue pour un hyperthermophile, *Methanopyrus kandleri* **[47]**.

---

9 - R désigne une chaîne contenant du ribose, un groupe phosphate, un groupe glutaryle (en C5).

5,10-méthényl-MPTH4 5,10-méthylène-MPTH4 5,10-méthyl-MPTH4

Tétrahydrométhanopérine (MPTH4)

3, 4 - Une cyclo-isomérase catalyse une cyclisation avec élimination d'une molécule d'eau. Le résultat est le N_5,N_{10}-méthényl-MPTH4. Celui-ci est réduit en N_5,N_{10}-méthylène-MPTH4 par la méthylène-MPTH4 déshydrogénase avec un partenaire qui n'est ni NAD^+ ni FAD, mais un composé flavinique désigné comme **F420** (avec un pic d'absorbance à 420 nm). La réaction est :

$$N_5,N_{10}\text{-méthényl}^+\text{-MPTH4} + \text{F420-}H_2 \longrightarrow N_5,N_{10}\text{-méthylène-MPTH4} + \text{F420} + H^+.$$

Le système ne peut avancer que si le F420 est réduit à nouveau. Une hydrogénase [NiFe] particulière, contenant du nickel et spécifique du F420 utilise H_2 comme source d'électrons. Le F420 est une **déazaflavine**, analogue à une flavine classique comme le FAD mais dotée d'un carbone à la position 5 à la place de l'azote. Cette différence est fondamentale, parce que le F420 est un accepteur de deux électrons à la fois pour devenir le F420H_2, alors que la réduction d'une flavine est possible électron par électron et peut passer par un stade intermédiaire radicalaire. Le F420 se prête donc à une utilisation plus rigide que celle des flavines [10]. En outre son potentiel d'oxydoréduction est plus bas, soit environ – 350 mV.

F 420 $\rightleftharpoons$ (2 H^+ + 2 e^-) F420-H_2

La déazaflavine des méthanogènes

---

10 - Une 5-déazaflavine est donc un accepteur d'hydrure, à la manière du NAD^+. Expérimentalement, les déazaflavines peuvent remplacer parfois le FAD ou le FMN lorsque la réaction supporte un échange de deux électrons. Si la réaction passe par un stade intermédiaire radicalaire de type semiquinone, une azaflavine est inhibitrice et sert d'outil pour examiner le mécanisme des réactions flaviniques.

Le recours au F420 n'est pas obligatoire. Deux catégories de déshydrogénases peuvent coexister dans le même organisme, celles qui dépendent de F420 (codées par gènes *mtd*) et celles qui en sont dépourvues et fonctionnent comme hydrogénases (codées par *hmd*). Les déshydrogénases à F420 (Mtd) de plusieurs espèces, dont *Methanosarcina barkeri* et *Methanopyrus kandleri* ont été purifiées **[48]** et ont donné lieu à des études de stéréochimie intéressantes **[49]**. Le F420 intervient dans (1), et la deuxième enzyme (Hmd) catalyse (2). À cela s'ajoute une troisième protéine qui réduit directement F420 avec l'hydrogène. L'enzyme est une hydrogénase à Ni atypique et dépourvue de noyaux fer-soufre. Elle obéit à un mécanisme particulier **[50]** et catalyse (3) :

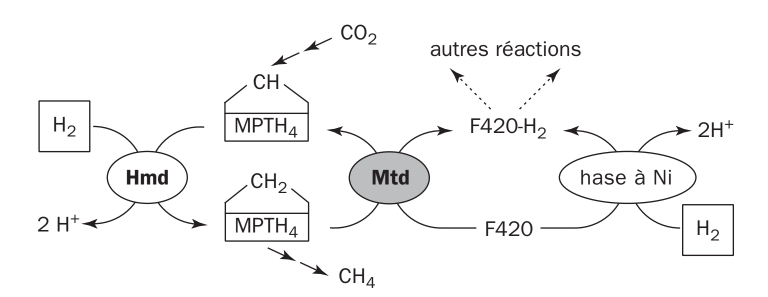
$$\mathbf{F420} + N_5,N_{10}\text{-méthényl}^{+}\text{-MPTH4} \rightarrow N_5,N_{10}\text{-méthylène-MPTH4} + \text{F420 réduit} + H^{+} \quad (1)$$

$$\mathbf{H2} + N_5,N_{10}\text{-méthényl}^{+}\text{-MPTH4} \rightleftharpoons N_5,N_{10}\text{-méthylène-MPTH4} + H^{+} \quad (2)$$

$$\mathbf{H2} + \text{F420} \longrightarrow \text{F420 réduit} + H^{+} \quad (3)$$

La réaction (2) mérite une parenthèse. Son caractère réversible lui permet de faire de l'hydrogène à partir du méthylène-MPTH4. L'enzyme Hmd est une déshydrogénase fonctionnant comme une hydrogénase particulière distincte par ses propriétés des autres hydrogénases, car elle n'a pas de noyau [NiFe], ne réduit pas les viologènes et ne catalyse pas l'échange H/D. Elle est inductible en conditions de carence en nickel **[51]**. On admet actuellement que cette hydrogénase possède un cofacteur qui serait constitué par du fer.

Pourquoi ce luxe de protéines différentes dans cette étape de la méthanogénèse ? Une explication partielle consiste à voir ce dispositif comme une parade aux conditions très changeantes du côté de la fourniture en hydrogène. Quand celui-ci est rare, la déshydrogénase à F420 est synthétisée en priorité par rapport à l'enzyme atypique Hmd.



Utiliser au mieux l'hydrogène

C'est l'inverse quand l'hydrogène est abondant. Mais la forme réduite du F420, soit F420-H_2, est précieuse car elle sert à faire marcher d'autres étapes réductrices de la méthanogénèse, et c'est pourquoi sa formation en permanence par la réaction (3) est rendue nécessaire. Sur un petit diagramme est figurée une chaîne réactionnelle. Elle met à contribution l'enzyme Hmd, qui réduit le méthényl-MPTH4. L'enzyme Mtd fait la même chose mais utilise F420-H_2 comme donneur à la place de H_2. Enfin l'hydrogénase à nickel réduit directement F420 avec l'hydrogène.

Quand l'hydrogène est abondant, le flux des électrons venant de l'hydrogénase Hmd, permet l'interconversion rapide entre méthényle et méthylène sur le MPTH4. Le va-et-vient entre ces deux formes permet à Mtd de maintenir un taux élevé du F420 réduit (F420-H_2) nécessaire à d'autres réactions de la méthanogénèse. Si l'hydrogène est peu abondant, l'hydrogénase à Ni, spécifique du F420, possède une plus forte affinité pour H_2 et alimente le système de droite à gauche sur le diagramme. Il est probable que ce modèle est très simplifié par rapport à la réalité, et que des mécanismes régulateurs complexes permettent d'optimiser les flux du carbone et des électrons.

5 - L'enzyme dont le nom complet est N_5,N_{10}-méthylène-MPTH4 réductase opère la réduction du méthylène en méthyle. Elle a été purifiée à partir de plusieurs espèces dont *Methanosarcina barkeri* **[52]**, et fonctionne avec le F420 réduit comme donneur d'électrons. Partant du CO_2, le carbone a donc subi trois réductions successives conduisant au stade méthyle qui équivaut au méthanol. Il faudra donc une réduction supplémentaire pour parvenir au méthane.

6 - Un transfert précède l'ultime réduction. Elle fait passer le méthyle sur un coenzyme caractéristique de la méthanogénèse ou **coenzyme M** (acide 2-mercapto-éthane-sulfonique). Ce facteur est un thiol et sera désigné en abrégé par HS-CoM. Une transférase établit la liaison thio-éther sur le coenzyme M :

$$CH_3\text{–MPTH4} + \text{HS–CoM} \longrightarrow \text{MPTH4} + CH_3\text{–S–CoM}$$

HS–CH₂–CH₂–SO₃⁻ (avant) … H_3C–S–CH₂–CH₂–SO₃⁻ (et après) méthylation

avant … et après méthylation

Le coenzyme M

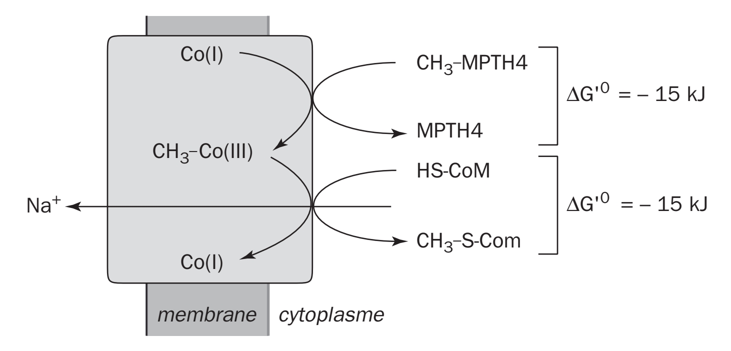
Cette réaction en apparence modeste est une des étapes énergétiques essentielles $\Delta G'° = -30$ kJ . mol^{-1} environ) et contribue à bâtir le potentiel membranaire. La méthyltransférase a trois caractères principaux. Elle est membranaire, contient un *corrinoïde** et fonctionne en expulsant des **ions sodium** à raison d'un rapport molaire de 1,7 Na^+ environ pour 1-méthyl-MPTH4 utilisé **[53]**. On a pu cloner et séquencer les gènes codant pour les 8 sous-unités différentes de la transférase [11] chez *Methanosarcina mazei* Gö1 **[54]**. Cette souche a offert un cadre favorable très utile à la recherche, car il est peu facile d'obtenir des vésicules isolées (liposomes) montrant des couplages énergétiques *in vitro* à partir des archaebactéries [12]. Cependant les méthanogènes connus montrent une grande diversité de propriétés physiologiques et de compositions enzymatiques. Il n'est pas sûr qu'on puisse extrapoler automatiquement les données acquises à partir de Gö1. Il a été montré expérimentalement que les cellules de *Methanosarcina barkeri* mises en présence

11 - L'enzyme est codée par l'opéron mtrEDCBAFGH. La sous-unité MtrA contient le corrinoïde.

12 - Cela est dû aux contacts étroits et interdigitations de la couche externe de glycoprotéines avec la membrane cytoplasmique proprement dite, et on ne peut pas décoller aussi facilement celle-ci du reste de l'enveloppe ou faire des protoplastes comme on le fait par exemple avec un colibacille.

des substrats H_2 et HCHO expulsaient des ions sodium, et que cette propriété se retrouvait dans des liposomes contenant la transférase. Le potentiel engendré par la translocation de Na^+ atteint 60 mV environ et résiste à l'action des ingrédients qui perméabilisent les membranes aux protons.

Le transfert fonctionnerait en deux temps. Le méthyle transporté par le MPTH4 serait déchargé sur le cobalt(I) du corrinoïde dans la transférase, formant une liaison transitoire CH_3–Co(III). Une oxydoréduction réversible et interne à l'enzyme ferait passer le cobalt à l'état Co(I), rompant la liaison et facilitant le transfert sur le coenzyme M. Chacune des deux étapes devrait engager une variation d'énergie d'environ – 15 kJ . mol^{-1}. La première n'est pas stimulée par les ions Na^+, contrairement à la seconde. On pense que la translocation du sodium est couplée au passage du méthyle entre cobalt et coenzyme M.

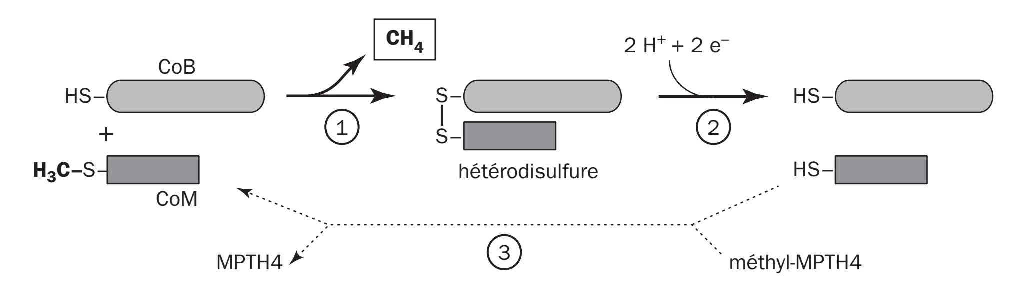


Rôle du corrinoïde dans le transfert de méthyle sur coenzyme M

L'intervention du corrinoïde ressemble à la situation décrite chez les acétogènes. On observe que le cobalt n'est oxydé que temporairement. Le potentiel membranaire formé est converti en ATP par une ATP synthase qui est mue par un gradient de Na^+ ou de H^+ selon les espèces.

Coenzymes de la phase finale

7 - La dernière étape de la méthanogénèse est la plus étrange. Le passage au méthane implique une dernière réduction à deux électrons du groupe méthyle. L'enzyme est la méthyl-coenzyme M réductase. Elle a deux cofacteurs, le **coenzyme B** (son nom chimique est donné en glossaire) et le **F430** (à ne pas confondre avec le F420)… Le coenzyme B est un thiol comme le CoM, mais sa chaîne est plus longue. Le F430 est une porphyrine modifiée renfermant du **nickel**.Le principe de la réaction paraît le suivant. La réduction du méthyle est compensée par l'oxydation des deux thiols, les coenzymes M et B qui vont former ensemble ce qu'on appelle l'hétérodisulfure. Le coenzyme M est occupé par le méthyle, mais celui-ci est chassé et réduit en CH_4 tandis que se forme le disulfure. Le schéma indique les trois phases essentielles.



Formation du méthane et de l'hétérodisulfure

La réaction **1** engendre le méthane et l'hétérodisulfure par une réaction d'oxydo-réduction. L'enzyme essentielle est appelée **méthyl-CoM réductase**, pour laquelle on a des renseignements détaillés chez *Methanobacterium thermoautrophicum* **[55]**. L'enzyme de 300 kDa est codée par de trois gènes *B*, *G* et *A* dans un opéron *mcrBDCGA*, possède 3 sous-unités différentes et une structure globale $\alpha_2 \beta_2 \gamma_2$ avec deux molécules de F430. Le nickel semble être un élément capital. Voici une interprétation. Le métal formerait une liaison temporaire avec le méthyle arraché au coenzyme M. Ce serait la vraie phase réductrice, pendant que le métal s'oxyderait de Ni(I) à Ni(III) [13], comme l'indique un schéma simplifié. On observe une ressemblance intéressante du comportement du nickel avec celui du cobalt dans le corrinoïde.

Naissance du méthane

13 - Observez le parallèle avec la liaison Co(III)-méthyle dans les corrinoïdes.

La deuxième réaction est donc celle qui rompt l'hétérodisulfure et régénère les deux thiols pour les rendre à nouveau disponibles. Ce rôle appartient à l'**hétéro-disulfure réductase**. Il est détaillé dans la section suivante. Cette nouvelle réductase est complètement distincte de la précédente. Elle est chargée de clore le cycle des opérations de régénération des deux thiols.

4.6 - L'ÉNERGIE DE L'HÉTÉRODISULFURE RÉDUCTASE

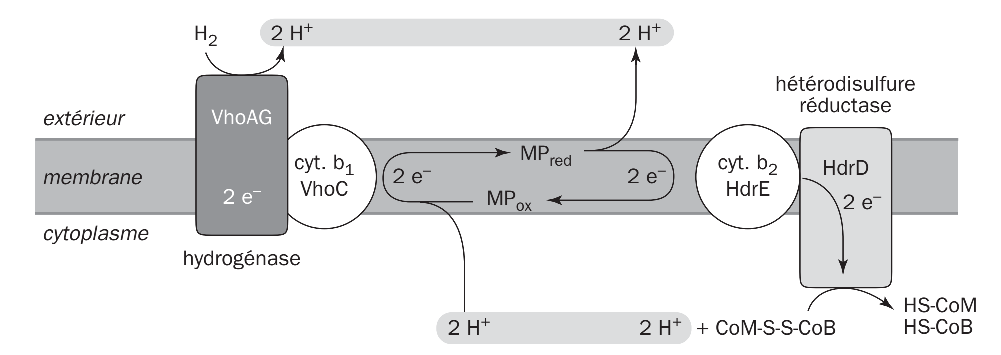
La réduction de l'hétérodisulfure formé entre les coenzymes M et B est un deuxième site de couplage énergétique après celui de la méthyl-transférase aperçu antérieurement. Une étape essentielle. Quel est son principe de ce couplage ? Si on fait le point, on constate que la réalisation du méthane est maintenant terminée. L'étape ultime consiste à rendre à nouveau disponibles le coenzyme M et l'autre thiol, le coenzyme B. C'est le rôle de cette réductase. L'opération a lieu dans la membrane. Le donneur est soit H_2, soit la déazaflavine réduite ($F420H_2$). Examinons le cas où le donneur est H_2. Son utilisation nécessite une hydrogénase, mais celle-ci ne sait pas transmettre les électrons directement à la réductase. Il faut un transporteur intermédiaire au sein de la membrane, un produit qui ressemble à une quinone respiratoire et lipophile comme elle. Il s'agit de la **méthano-phénazine** (MP) **[56]**. Elle n'a été mise en évidence ailleurs que chez les espèces méthylotrophes, qui oxydent du méthanol. En dépit de cette exception qui est peut-être une survivance évolutive ancienne ou une convergence, ce cofacteur reste particulier à la méthanogénèse.

N
N
O
forme oxydée
H
N
N
H
forme réduite

Méthanophénazine

Une mini-chaîne de transporteurs entre l'hydrogène et l'hétérodisulfure est symbolisée par une figure. Des protons sont émis sur la face extérieure. Les principaux résultats expérimentaux ont été acquis avec *Methanosarcina mazei* **[57]**. L'hydrogénase est désignée par son sigle génétique **VhoAG**. Elle ne fonctionne pas avec le F420 réduit. Le transport des électrons fait appel à des cytochromes et à la méthanophénazine figurée par **MP**.

La membrane est symbolisée à la page suivante comme vue par sa tranche, face extérieure en haut, cytoplasmique en bas. L'**hydrogénase** à gauche forme un complexe de trois sous-unités, VhoA, VhoG et VhoC. Cette dernière est un cytochrome b_1. Par les homologies de séquence, il a été démontré que VhoAG ressemble aux hydrogénases [Fe-Ni] des eubactéries.



La réductase HdrDE

C'est donc un système doté d'une structure courante, la partie cytochrome étant surajoutée.L'**hétérodisulfure réductase** forme un complexe de deux sous-unités, HdrD où se trouve le site actif ainsi que deux noyaux [4Fe-4S] **[58]**. HdrE est un cytochrome b_2. Enfin la **méthanophénazine** (MP) fait un va-et-vient entre les deux systèmes. Elle peut être remplacée expérimentalement par un analogue soluble plus facile à utiliser, la 2-hydroxyphénazine, et son cycle rappelle celui d'une quinone dans une chaîne respiratoire classique.

En comptabilisant les protons échangés par l'ensemble, on voit que quatre protons sont prélevés dans le cytoplasme, et quatre autres sont émis au-dehors. Pour chaque paire d'électrons transférés à partir d'une molécule d'hydrogène, il y a donc un pompage théorique de quatre protons. L'expérience en indique 3,6. Le saut énergétique total est de l'ordre de $-42\ kJ \cdot mol^{-1}$, suffisant pour la formation d'une molécule d'ATP ($-32\ kJ \cdot mol^{-1}$ à l'état standard). On estime que dans les conditions réelles où le taux d'hétérodisulfure prédomine sur celui des thiols à l'état séparé, l'énergie disponible est nettement supérieure.

L'hydrogénase VhoAGC n'est pas seule à pourvoir un pouvoir réducteur pour ce système. Une autre hydrogénase peut la remplacer en catalysant :

$$\mathbf{F420\text{-}H_2} + \text{méthanophénazine}_{ox} \longrightarrow \text{F420} + H_2 + \text{méthanophénazine}_{red}.$$

L'énergie serait libérée en deux temps. On sait que le F420-H_2 est produit par d'autres réactions en amont. Cette hydrogénase, qu'on appelle aussi la **F420-H_2 déshydrogénase**, pourrait aussi faire une translocation de protons à la manière de la NADH déshydrogénase mitochondriale. L'étude expérimentale faite avec des membranes isolées de *Methanosarcina mazei* semble confirmer cette analogie. Elle montre qu'il y a bien établissement d'un gradient transmembranaire de H^+ au cours de l'oxydation de la F420-H_2. La méthanophénazine est représentée par son analogue soluble, la 2-hydroxyphénazine (2OH-P) **[59]**, et les membranes isolées catalysent les deux réactions successives :

H_2 + 2OH-P $\rightarrow$ dihydro-2-OH-phénazine (2OH-PH_2) ($\Delta G'° = -31{,}8\ kJ \cdot mol^{-1}$)

2OH-PH_2 + CoM-S-S-CoB $\rightarrow$ 2OH-P + HS-CoM + HS-CoB ($\Delta G'° = -10{,}6\ kJ \cdot mol^{-1}$)

Ces réactions sont donc exothermiques l'une et l'autre. La seconde n'est autre que celle de l'hétérodisulfure réductase. L'expérience montre que les membranes sont le siège à la fois d'un gradient de protons et d'une synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate. Chaque réaction s'accompagne d'une translocation de protons dans un rapport $H^+/2e^-$ dont la valeur mesurée est au plus de 0,9 pour chacune. La Δp qui en résulte est suffisante pour une synthèse d'ATP. Les mesures indiquent 0,25 ATP par paire d'électrons. L'action de découplants confirme que l'une et l'autre de ces étapes sont productrices d'énergie utilisable par la cellule.

Si on fait le bilan des aspects énergétiques de la méthanogénèse à partir de $CO_2 + H_2$, on voit qu'elle entraîne la formation d'un potentiel ionique fondé sur un gradient de protons ou d'ions Na^+. Nous avons vu en effet que le sodium intervient aussi dans certaines étapes énergétiques.

L'ATP peut-il être formé à la fois à partir de $\Delta\mu_{Na^+}$ et $\Delta\mu_{H^+}$? La question reste controversée, mais la tendance est de l'expliquer par la présence de deux facteurs, un **antiporteur Na^+/H^+** (un ion Na^+ rentre pour un proton qui sort), et une **ATP synthase de type F** couplant la synthèse d'ATP avec le retour des protons vers l'intérieur **[60]**. Il est néanmoins possible que certains méthanogènes possèdent une ATP synthase capable d'effectuer ce couplage directement avec les ions sodium. Un tel dispositif est connu en détail dans une eubactérie, *Propionigenium modestum*.

En conclusion de ces deux dernières sections, nous assistons à une biochimie étonnante qui s'écarte des circuits classiques présents dans la majorité des espèces vivantes, et loin de faire figure d'organismes frustes et primitifs, les méthanogènes révèlent en fait une physiologie très sophistiquée. L'énergie dégagée par la fabrication du méthane est récupérée en grande partie par un potentiel membranaire. La méthanogénèse est une oxydation d'hydrogène par le CO_2 comme accepteur et apparaît en principe comme une respiration anaérobie sur CO_2. En somme le méthane n'est pas un produit de fermentation au sens biochimique du terme, contrairement à ce que l'on croit souvent.

4.7 - DE L'ACIDE ACÉTIQUE AU MÉTHANE

Une part importante du méthane de la biosphère tire son origine de l'acide acétique produit par les fermentations et les acétogènes. C'est l'**acétotrophie**, étudiée en particulier avec *Methanosarcina thermophila*. La synthèse de méthane à partir de l'acide acétique est dite **acétoclastique**. Le MPTH4 y est remplacé par un cofacteur très voisin appelé tétrahydrosarcinaptérine (SPTH4) **[61]**, une particularité relativement peu importante car le fonctionnement reste exactement le même [14]. Pour faciliter la compréhension, la notation MPTH4 a été conservée ici tout en gardant en mémoire cette petite différence.

---

14 - La chaîne latérale hydroxyglytaryle est allongée par une liaison amidique avec l'acide glutamique.

L'acide acétique est traité de la façon suivante :

$$\text{Acétate} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Acétyl-phosphate} + \text{ADP} \quad (1)$$

$$\text{Acétyl-phosphate} + \text{HS-CoA} \longrightarrow CH_3CO\text{-S-CoA} + \text{phosphate} \quad (2)$$

$$\mathbf{CH_3CO}\text{-S-CoA} + \text{MPTH4} + H_2O \rightleftharpoons \mathbf{CH_3}\text{-MPTH4} + \text{HS-CoA} + \mathbf{CO_2} + \mathbf{2H^+} + \mathbf{2e^-} \quad (3)$$

La réaction (3) portant sur l'acétyl-coenzyme A est la plus importante, car elle revient à scinder réversiblement l'acétyle en méthyle et CO_2 avec libération d'un pouvoir réducteur emporté par une ferrédoxine réduite. Ce mécanisme est indirectement générateur de méthane, car le CH_3-MPTH4 peut décharger son méthyle sur le coenzyme M. Ce dernier participera à son tour à la formation de l'hétérodisulfure comme décrit antérieurement. La réaction (3) a une très grande importance car elle peut marcher dans les deux sens. En fonctionnant de droite à gauche, elle fait de l'acétyl-CoA susceptible d'entrer dans le métabolisme cellulaire comme point de départ de multiples synthèses, l'indispensable source de carbone sans laquelle les méthanogènes ne sauraient se développer. Mais le dioxyde de carbone est utilisé par la réaction (3) dans la direction inverse. Il s'agit d'une véritable assimilation de CO_2, l'acétyl-CoA étant le maillon initial qui permettra la synthèse de tous les autres constituants cellulaires. La même réaction nécessaire à la méthanogénèse à partir de l'acétate est donc aussi à la base d'une autotrophie, puisque le CO_2 est utilisable comme seule source de carbone. Par sa réversibilité, la réaction (3) fait se superposer deux protocoles distincts, la méthanogénèse acétoclastique, qui est productrice d'énergie, et l'assimilation du CO_2. Lorsque la méthanogénèse fonctionne, celui-ci n'est pas totalement récupéré. La méthanogénèse sur acétate laisse échapper un peu de dioxyde de carbone dont l'origine est prouvée par les expériences de marquage.

Pour synthétiser l'acétyl-coenzyme A, le méthyl-MPTH4 fournira le groupe méthyle tandis que le carbonyle sera produit par la réduction de CO_2 en CO **[62]**. Cette opération est catalysée par la **CO déshydrogénase**. Cette enzyme déjà rencontrée chez les acétogènes fonctionne ici selon un principe similaire, soit pour la scission de la liaison C-C dans l'acétyl-CoA, soit comme **acétyl-CoA synthase**. Nous la désignerons en abrégé par CODH/ACS. La réaction (3) n'allant pas jusqu'au bout s'arrête au monoxyde de carbone en devenant :

$$CH_3CO\text{-S-CoA} + \text{MPTH4} \rightleftharpoons CH_3\text{-MPTH4} + \text{HS-CoA} + \mathbf{CO} \quad (4)$$

Le CH_3-MPTH4 est alors la source du méthane par le même cheminement que vu antérieurement. L'acétate pourrait avoir existé aux temps les plus anciens de l'évolution. Cette réaction représenterait un modèle primitif d'autotrophie dans une atmosphère primitive, et les fortes homologies de séquence relevées en comparant les enzymes clés dans les bactéries et les archaebactéries semblent indiquer qu'il a été repris dans des directions parallèles, mais avec des différences dans la stratégie utilisée **[63]**. Ainsi chez les bactéries acétogènes, le gaz carbonique était réduit et activé en phase soluble à grand renfort d'ATP avant d'être transformé en formyl-FH4 par le canal de la formiate déshydrogénase et de la formyl-FH4 synthétase. Le potentiel du couple CO_2 + méthanofurane/formyl-méthanofurane est vers – 500 mV. Il est compensé par un courant d'électrons inverse actionné par le potentiel membranaire (H^+ ou Na^+).

La CO déshydrogénase dite CODH/ACS est donc à la fois au cœur de la méthanogenèse acétoclastique et de l'autotrophie des archaebactéries du type *Methanosarcina*. On admet provisoirement que l'enzyme fonctionne par un mécanisme inverse de celui qui a été décrit chez les acétogènes du genre *Clostridium* **[64]**. Rappelons que la CODH/ACS a la particularité de renfermer du **nickel**.

La CODH/ACS de *Methanosarcina barkeri* et de *M. thermophila* est un complexe de masse moléculaire très élevée (1600 kDa environ) de formule $\alpha_6\,\beta_6\,\gamma_6\,\delta_6\,\varepsilon_6$. On y distingue plusieurs parties **[65]**, dont l'acétyl-CoA synthase proprement dite par les sous-unités, désignées ici α, β et ε, avec un site actif porté par les sous-unités appelées ici β et rappelant celui de la CODH des acétogènes. On y trouve du nickel et des noyaux [4Fe-4S]. Tous les auteurs s'accordent pour reconnaître le caractère essentiel du nickel. La présence du cuivre reste à confirmer, mais elle semble probable car Cu a été détecté depuis longtemps dans la CODH/ACS de *M. barkeri* **[66]**. C'est un point qui reste obscur. Le lieu où se fait ou se défait la liaison C–C de l'acétyle est un noyau bi-métallique spécial de type Ni-x-[4Fe-4S]. Les sous-unités γ et δ correspondent à la méthyl-transférase et renferment le corrinoïde.

Le mécanisme enzymatique regardé ici dans le sens acétyl-CoA → méthyle + CO est encore imparfaitement connu et sujet à controverses. L'intervention du fer et du nickel a été prouvée par RPE, et apparaît comme certaine.

Le groupe méthyle né de la rupture de l'acétyle est injecté sur le corrinoïde d'une sous-unité voisine, moyennant un changement de valence du cobalt sur le principe expliqué antérieurement. Le méthyle sera transmis par la suite au coenzyme M en vue de la préparation du méthane. Le carbonyle quitte le site actif sous forme de monoxyde de carbone. Celui-ci reste attaché au complexe où il migre sur un site (appelé site C) contenant aussi, croit-on, un noyau bi-métallique renfermant du nickel et un noyau [4Fe-4S] qui serait le support de l'activité CO déshydrogénase. Les ions cyanure inhibent fortement cette phase. Le monoxyde de carbone reste lié à l'enzyme tant qu''il n'a pas été oxydé. Les électrons libérés par cette oxydation électrons sont échangés avec l'extérieur par l'intermédiaire d'une ferrédoxine, et ils seront utilisés dans la conversion du méthyl-coenzyme M en méthane.

$$[CO] + \text{Ferrédoxine oxydée} + H_2O \longrightarrow CO_2 + \text{Ferrédoxine réduite} + 2\,H^+$$

La ferrédoxine réduite cède les électrons à une oxydoréductase membranaire qui fait office d'hydrogénase comme dans le système rencontré antérieurement, avec la chaîne :

cytochrome b_1 → méthanophénazine → cytochrome b_2 → hétérodisulfure réductase.

Le fonctionnement de la CODH/ACS rejoint donc le mécanisme déjà rencontré.

On s'attend à trouver de grandes similitudes de mécanisme entre l'acétyl-CoA synthase des méthanogènes et celle des acétogènes, la première pratiquant la méthanogénèse acétoclastique. On constate cependant des divergences d'une espèce à l'autre et la prudence s'impose. Il n'y a qu'une homologie de séquence insignifiante entre ces enzymes des acétogènes au méthanogènes. Il apparaît qu'elles ont divergé dans des temps très anciens de l'évolution sans qu'on puisse dire si le mécanisme de la catalyse a été exactement conservé. Tout le monde

s'accorde à penser qu'il s'agit bien d'un modèle d'autotrophie très primitif, dont il existe des vestiges chez des bactéries phototrophes .

À la méthanogénèse sur acide acétique se trouve associée une **anhydrase carbonique**. Cette enzyme catalyse la réaction : $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$. La réaction n'a pas besoin de catalyseur pour fonctionner dans un sens ou dans l'autre, mais elle est accélérée d'un facteur énorme par les anhydrases carboniques isolées un peu partout dans le monde vivant, chez les animaux, plantes, cyanobactéries et bactéries. Celles des archaebactéries appartiennent à un type spécial mais fonctionnent comme les autres avec du zinc. On dispose d'une structure détaillée de cette enzyme dans le cas de *Methanosarcina thermophila* **[67]**.

Quelle peut être l'utilité de l'anhydrase carbonique au cours de la méthanogénèse, puisqu'elle ne fait qu'accélérer une réaction qui se produirait de toute façon sans elle ? Si on se reporte à l'énergie produite par la méthanogénèse acétoclastique (-36 kJ.mol^{-1} dans les conditions standard), il est clair qu'elle est assez faible, car elle naît principalement de la réduction du méthyl-CoM. Le résultat devrait être amélioré si le gaz carbonique engendré après rupture de l'acétyl-CoA était rapidement soustrait de l'équilibre dès son apparition, déplaçant celui-ci dans un sens favorable et renforçant la production d'énergie. C'est peut-être le rôle de l'anhydrase de soutirer le plus rapidement possible le CO_2 formé afin d'améliorer le gain énergétique.

4.8 - MÉTHANOGÈNES ET BIODÉGRADATIONS

Les archaebactéries méthanogènes se développent dans des milieux strictement anaérobies, localisés en principe dans les couches les plus profondes d'une stratification où se succèdent à partir de la surface les aérobies, les dénitrifiants, les bactéries réductrices du fer et du manganèse, les sulfato-réducteurs, les acétogènes, et finalement les méthanogènes. Les biodégradations de substances naturelles ou xénobiotiques peuvent avoir lieu à tous les niveaux, mais les plus actives sont généralement dans les milieux aérobies. C'est une constatation facile à faire par la pratique du compostage. On pourrait supposer que certains polluants transportés profondément à l'abri de toute trace d'oxygène deviennent récalcitrants à une biotransformation et conduire à des accumulations nuisibles.

Comparées aux aérobies tels que les *Pseudomonas*, ou encore les bactéries qui oxydent le méthane, les méthanogènes peuvent apparaître comme des organismes très spécialisés disposant de potentialités limitées en dehors de leur métabolisme très particulier et inimitable. Les méthanogènes sont tributaires de produits simples qui sont générés par les autres, comme l'hydrogène, le gaz carbonique, l'acide acétique et quelques produits carbonés à faible masse moléculaire. Ils sont néanmoins capables de transformer en méthane des substrats plus élaborés tels que des glucides. On peut donc supposer que la méthanogénèse peut s'accomplir sur une variété de composés plus grande qu'initialement escompté. La difficulté des recherches est d'ordre technique. Le développement des méthanogènes est

relativement lent, et nécessite des contraintes qui n'ont rien à voir avec celles des organismes versatiles à développement très rapide comme la plupart des bactéries élevées au laboratoire. L'isolement de méthanogènes pour les études de biodégradation se fait généralement à partir de vases et sédiments où le dégagement de CH_4 est constaté. L'oxygène, le nitrate, le fer et le sulfate doivent avoir pratiquement disparu, mettant hors course les compétiteurs. De très nombreuses recherches ont eu lieu pour tenter de comprendre comment des contaminants peuvent être épongés par l'action des méthanogènes, qui représentent en fait le dernier recours quand les autres possibilités sont épuisées. Un exemple représentatif est le travail de ZENGLER et coll **[68]**. Un enrichissement progressif a été fait à partir d'un échantillon de sédiment, dans un milieu minéral sans sulfate et privé d'oxygène, contenant un tampon bicarbonate à pH 7 et du sulfure comme source de soufre. Le substrat carboné était un hydrocarbure (hexadécane). L'expérience a duré de un à deux ans. Le gaz formé était principalement du méthane, qui apparaissait seulement lorsque l'hydrocarbure était présent. Cette lente transformation s'expliquait par l'association de plusieurs groupes de micro-organismes acétogènes et archaebactériens. Leur relation était celle du **syntrophisme**. Des acétogènes dégradaient l'alcane. L'hydrogène, le gaz carbonique et l'acide acétique étaient récupérés par les méthanogènes pour faire du méthane.

$$4\ \mathbf{C_{16}H_{34}} + 64\ H_2O \longrightarrow 32\ CH_3COO^- + 32\ H^+ + 68\ H_2 \quad (\Delta G = -929\ kJ) \qquad (1)$$

$$32\ CH_3COO^- + 32\ H^+ \longrightarrow 32\ \mathbf{CH_4} + 32\ CO_2 \quad (\Delta G = -385\ kJ) \qquad (2)$$

$$68\ H_2 + 17\ CO_2 \longrightarrow 17\ \mathbf{CH_4} + 34\ H_2O \quad (\Delta G = -282\ kJ) \qquad (3)$$

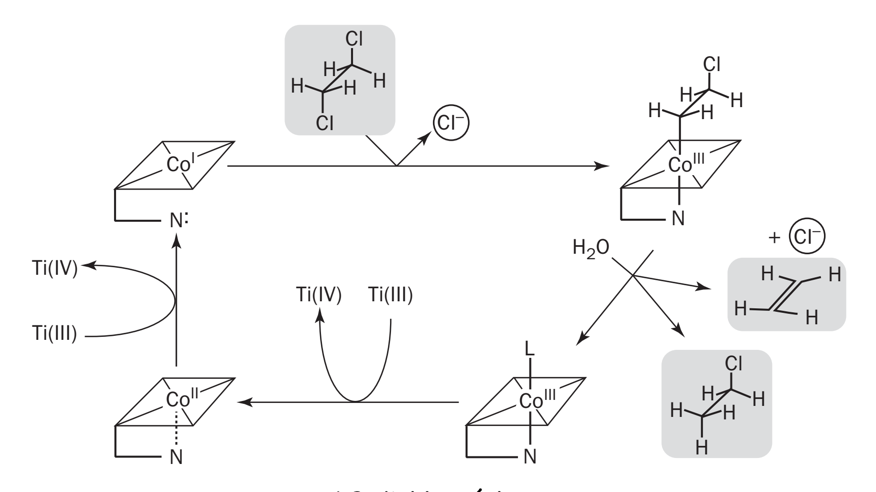
Le bilan total est :

$$4\ \mathbf{C_{16}H_{34}} + 30\ H_2O \longrightarrow 49\ \mathbf{CH_4} + 15\ CO_2 \quad (\Delta G = -1596\ kJ) \qquad (4)$$

Les réactions (2) et (3) sont celles des méthanogènes. Les variations d'énergie libre ne sont pas à l'état standard, mais sont des valeurs moyennes estimées à partir des concentrations réelles. La consommation de l'hydrogène au fur et à mesure de sa production est un point important, sinon la réaction (1) des acétogènes ne produiraient aucune énergie. La quantité réelle de méthane enregistrée au cours de la consommation d'hexadécane était un peu inférieure à la quantité théorique, probablement à cause des pertes de gaz et du détournement du carbone pour les synthèses cellulaires. L'emploi d'hexadécane enrichi en carbone-13 a révélé que le méthane formé était bien produit à partir de l'hydrocarbure, malgré le risque d'artefact introduit par l'usage du bicarbonate comme tampon. Quelle est la nature de l'association microbienne ? Les analyses d'ARN 16S ont indiqué par comparaison avec les séquences connues la présence de protéobactéries de la classe delta, de méthanogènes acétoclastiques (proches de *Methanosaeta*) et de méthanogènes utilisateurs de CO_2 et de H_2.

Les méthanogènes peuvent réaliser par eux-mêmes une **déchloration** de substrats carbonés chlorés à un ou deux atomes de carbone. Cette propriété est partagée par d'autres espèces anaérobies qui ont toutes en commun l'utilisation de la voie de WOOD-LJUNGDAHL où intervient l'acétyl-CoA synthase. Le tétrachlorométhane (CCl_4) est transformé en produits partiellement déchlorés ou en CO_2 par des méthanogènes,

des acétogènes (*Acetobacterium woodii*) et des sulfato-réducteurs (*Desulfobacterium autotrophicum*). Cette transformation est observable avec des suspensions cellulaires ou des extraits autoclavés, ce qui souligne le pouvoir catalytique d'au moins un des cofacteurs de la voie de WOOD-LJUNGDAHL, à savoir un corrinoïde. Cette hypothèse est clairement vérifiée dans le cas de *Methanosarcina barkeri*. Ce méthanogène transforme le 1,2-dichloroéthane en chloroéthane ou en éthylène. Or cette intéressante déshalogénation appartient aussi à la cobalamine ou au F430, à condition de placer dans le milieu du citrate de titane, Ti(III), afin de maintenir un bas potentiel réducteur (voir *Titane**). Le premier cofacteur a du cobalt, le couple Co(II)/Co(I) a un potentiel de – 610 mV. Le second a du nickel, avec un couple Ni(II)/Ni(I) dont le potentiel est comparable au précédent. Ces deux cofacteurs ont donc par eux-même un puissant pouvoir catalytique qui explique facilement l'action des cellules méthanogènes. Le cycle catalytique pour la cobalamine serait le suivant. Le citrate de Ti(III) servirait de source d'électrons. Le cobalt(I) réagirait avec le substrat par oxydation en Co(III) avec le départ du chlorure et la formation d'une liaison Co–C. Nous retrouvons les changements structuraux des liens autour du *cobalt** en fonction de l'état d'oxydoréduction, rencontrés précédemment et expliqués en glossaire. La lettre L symbolise une liaison interne formée sur la cobalamine au cours de ces changements.



1,2-dichloroéthane

Le F430 catalyserait un cycle similaire, selon un mode en partie radicalaire et un passage alterné du nickel entre Ni(I) et Ni(II). L'attaque du substrat se ferait par Ni(I), le citrate de titane étant utilisé comme source d'électrons. Cette remarquable chimie non enzymatique a été étudiée par HOLLIGER et coll. **[69]** et s'est trouvée facilitée par les modifications spectrales des catalyseurs. Elle permet de comprendre le mode d'action des méthanogènes dans ces déshalogénations. Des études ont lieu en vue d'applications pour l'assainissement des eaux contaminées par des hydrocarbures halogénés, notamment au Canada.

Une opinion généralement admise veut que les méthanogènes puissent participer à des biodégradations dans les sédiments profonds à la faveur d'un syntrophisme

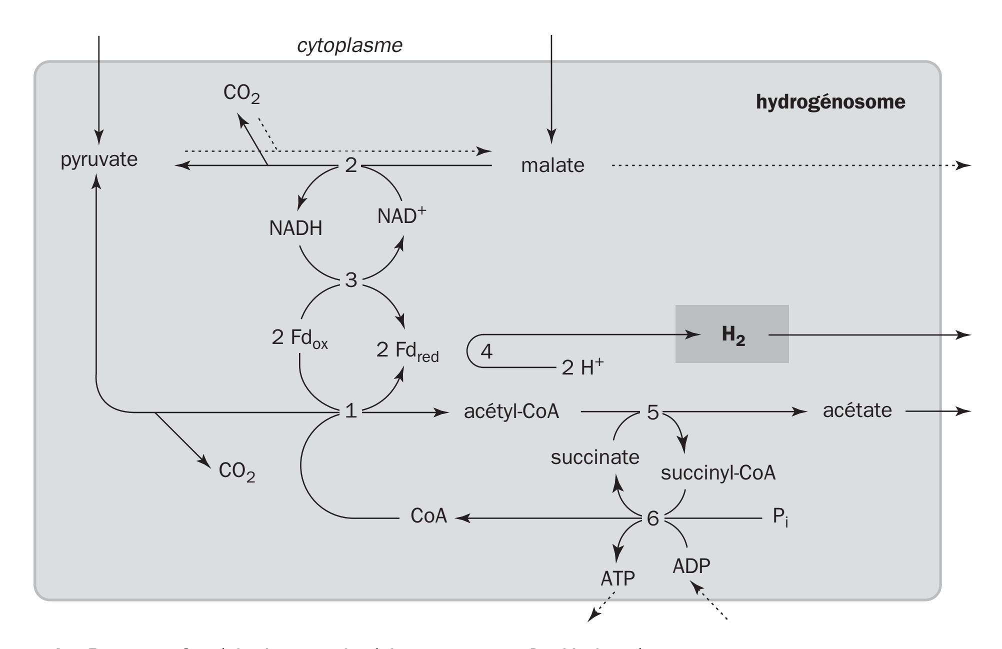
avec d'autres espèces. Ils seraient les éboueurs terminaux utilisateurs des sous-produits de l'activité de leurs partenaires. C'est peut-être leur fonction dominante dans les équilibres naturels. On peut les voir en particulier comme des organismes qui contribuent à détoxifier l'acide acétique et l'hydrogène. Dans la section suivante, nous rencontrerons des méthanogènes dans une symbiose de type original.

4.9 - HYDROGÉNOSOMES

À la fin de ce chapitre où nous avons examiné la genèse de l'hydrogène, de l'acétate et du méthane, il convient de citer une bizarrerie de la nature : les **hydrogénosomes**. Ce sont particules subcellulaires, d'une taille comparable à celle des mitochondries (0,5-2 µm), observées pour la première fois dans un eucaryote parasite unicellulaire responsable d'infections vénériennes, *Trichomonas vaginalis*. On a pu les obtenir à l'état isolé et déterminer leur biochimie. Leur propriété essentielle est de produire, en anaérobiose, de l'acétate à partir du pyruvate, ainsi que H_2 et CO_2 en quantités comparables. En présence d'oxygène, les particules effectuent une respiration sans faire d'hydrogène, mais dégénèrent rapidement sans doute à cause de l'apparition de peroxyde et de superoxyde. Le terme d'hydrogénosome est dû à LINDMARK et MÜLLER **[70]**.

Les hydrogénosomes n'ont encore jamais été rencontrés chez les animaux pluricellulaires et les plantes. Ils existent dans les champignons et protozoaires ciliés du rumen ainsi que dans les euglènes. Leur structure est assez rudimentaire, comportant le plus souvent une seule membrane. Ils sont en principe dépourvus d'ADN, et leur synthèse interne à la cellule relève de gènes localisés dans le noyau. Les cellules qui les hébergent n'ont bien souvent ni peroxysomes, ni mitochondries, et vivent généralement en milieu quasi-anaérobie. Les hydrogénosomes tiennent lieu de producteurs d'énergie, non pas comme les mitochondries en faisant un potentiel membranaire, mais en synthétisant de l'ATP au niveau du substrat comme dans une fermentation. Un tableau simplifié représente le métabolisme anaérobie observé dans ces particules **[71]**. Il indique les enzymes utilisées, et met en évidence le rôle d'une ferrédoxine (Fd) contenant des noyaux [2Fe-2S], d'une hydrogénase et du coenzyme A (CoA). La déshydrogénase **2**, d'un type particulier puisqu'elle conduit à une décarboxylation, est couramment appelée enzyme malique chez les plantes où elle est omniprésente. Les particules comportent un certain nombre de transporteurs membranaires. Le pyruvate est issu du métabolisme du glucose. On constate qu'il y a un seul ATP formé à partir d'une molécule de pyruvate.

La transformation de l'acétyl-CoA en acétate présente une variante intéressante dans les protozoaires du rumen. Il y a d'abord conversion de l'acétyl-CoA en acétyl-phosphate, et c'est celui-ci qui sert de donneur à la synthèse d'ATP. Cette particularité est intéressante, car elle est typique du métabolisme des procaryotes dans certaines fermentations. On ne la trouve pas normalement chez les eucaryotes. Un autre caractère étonnant s'observe chez les protozoaires ciliés.



1 - Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase
2 - Malate déshydrogénase (enz. malique)
3 - NAD-ferrédoxine oxydoréductase
4 - Hydrogénase
5 - Acétate-succinate CoA transférase
6 - Succinate thiokinase

Tous ceux qui ont des hydrogénosomes hébergent en même temps des endosymbiontes. Les hydrogénosomes et les symbiontes sont en contact assez étroit à l'intérieur des cellules. On s'est aperçu que ces derniers étaient des archaebactéries méthanogènes, trahis par la fluorescence de leur cofacteur F420 ! L'explication serait la suivante. Les méthanogènes récupèrent le gaz carbonique et l'hydrogène, éventuellement l'acétate, pour la synthèse du méthane. Des échanges ont lieu à l'intérieur de la cellule. Les ciliés dépourvus d'endosymbiontes produisent de l'hydrogène, ceux qui en possèdent n'en font pas. Il y a des cas particuliers. Par exemple *Giardia intestinalis*, un agent banal des désordres intestinaux, n'a pas d'hydrogénosomes, et pourtant il fait de l'hydrogène, ce qui constitue une énigme **[72]** !

Il s'avère que les protozoaires et champignons à hydrogénosomes sont peut-être légion dans l'environnement. Au fond ces particules aident les cellules à survivre dans un environnement anaérobie, ce que la plupart des eucaryotes ne font que difficilement ou au prix de métabolismes d'attente insuffisants pour la croissance. Les hydrogénosomes participent au flux métabolique de la cellule et contribuent à faire de l'ATP. Mais la question de leur nature et de leur origine se pose. Ils présentent avec les mitochondries des analogies certaines. Les similitudes portent sur les séquences de diverses protéines comme les ferrédoxines **[73]**, la succinate thiokinase **[74]**, l'adenylate kinase et des protéines de transport. Un indication très probante est la similitude constatée entre les protéines dites du *stress**, Hsp60 et Hsp70 parmi les bactéries, les mitochondries et les hydrogénosomes. La parenté avec les mitochondries a fait l'objet de nombreuses spéculations.

Les mitochondries sont supposées dériver des α-protéobactéries. Il est possible que les hydrogénosomes résultent d'une ou plusieurs symbioses survenues avant l'apparition des mitochondries dans les cellules des eucaryotes **[75]**. La dégradation des bactéries d'origine serait allée plus loin, conduisant à la capture totale du matériel génétique au profit du noyau, alors que les mitochondries conservent encore un ADN et des synthèses autonomes. Une autre hypothèse consiste à supposer une origine commune aux mitochondries et aux hydrogénosomes. Les premières mitochondres auraient colonisé des eucaryotes primitifs dotés d'un métabolisme anaérobie. Ces premières mitochondries auraient pu faire de l'ATP par respiration anaérobie sur fumarate et nitrate, contrairement aux mitochondries de la quasi-totalité des eucaryotes modernes qui utilisent le dioxygène. Des mitochondries utilisatrices de nitrate ont été aperçues chez divers champignons et protozoaires amenés à manquer d'oxygène dans leur habitat. Les hydrogénosomes auraient donc pu dériver des mitochondries les plus primitives.

La question a été relancée par la découverte d'un ADN dans certains hydrogénosomes présents dans *Nyctotherus ovalis*, un cilié hétérotriche de l'intestin des grandes blattes (*Periplaneta americana*). L'ADN a été détecté par une méthode immunologique. L'amplification de cet ADN et l'examen d'une séquence de 3,6 kb révèle un segment susceptible de coder pour une hydrogénase à fer seul, avec des sites de liaison pour le FAD et NAD^+ qui suggèrent une fonction de réoxydation de NADH **[76]**. L'hydrogénase présumée serait bien codée en partie par l'ADN des hydrogénosomes, et en partie par l'ADN nucléaire. Cette question originale et intéressante pose encore plus de questions qu'elle n'en résoud. Tous les organismes détenteurs d'hydrogénosomes vivent dans des niches écologiques anaérobies ou à faible taux d'O_2. Ils sont néanmoins dispersés dans plusieurs groupes évolutifs qui contiennent des espèces voisines hébergeant toutes des mitochondries. Il est donc probable qu'il y a plusieurs lignées conduisant aux hydrogénosomes. L'évolution et la signification de ces étranges symbiontes sont encore des challenges pour la recherche. Cette question inédite et encore entourée de mystère termine à point nommé un chapitre où les solutions naturelles originales n'ont pas manqué.

CONCLUSION

Dans ce chapitre nous avons ajouté une pièce au grand cycle du carbone dans la biosphère, souligné le rôle central de l'acide acétique, rencontré la biochimie très particulière de la méthanogénèse. Les organismes responsables contribuent à étendre aux milieux anaérobies le champ des biodégradations. Ils ont divergé et se sont diversifiés depuis une période très ancienne, utilisant des mécanismes qui ont fonctionné tout au long de la longue période d'évolution pour laquelle nous avons des traces. Dans le chapitre suivant, nous reviendrons au cycle de l'azote, déjà entrevu avec l'oxydation de l'ammoniac, pour entrer dans des étapes essentielles observées là encore dans les milieux anaérobies.

RÉFÉRENCES

[1] VIGNAIS PM & COLBEAU A (2004) *Curr. Issues Mol. Biol.* **6** : 159-188.

[2] GHIRARDI ML, ZHANG L, LEE JW,FLYNN T, SEIBERT M, GREENBAUM E & MELIS A. (2000) *Trends Biotechnol*. **18** : 506-511.

[3] VOLBEDA A, CHARON MH, PIRAS C, HATCHIKIAN EC, FREY M & FONTECILLA-CAMPS JC. (1995) *Nature* **373** : 556-557 ;
FONTECILLA-CAMPS JC, FREY M, GARCIN E, HATCHIKIAN C, MONTET Y, PIRAS C, VERNEDE X & VOLBEDA A (1997) *Biochimie* **79** : 661-666 ;
HIGUCHI Y, OGATA H, MIKI K, YASUOKA N & YAGI T (1999) *Structure Fold* **7** : 549-556 ;
DE LACEY AL, SANTAMARIA E, HATCHIKIAN EC & FERNANDEZ VM (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1481** : 371-380.

[4] VOLBEDA A, GARCIN E, PIRAS C, DE LACEY AL, FERNANDEZ VM, HATCHIKIAN EC, FREY M & FONTECILLA-CAMPS JC (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118** : 12989-12996.

[5] VIGNAIS PM, BILLOUD B & MYER J (2001) *FEMS Microbiol. Rev.* **25** : 455-501.

[6] ROBERTS LM & LINDAHL PA (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117** : 2565-2572 ;
PAVLOV M, SIEGBAHN PEM, BLOMBERG MRA & CRABTREE RH (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120** : 548-555 ;
CAMMACK R (1999) *Nature* **397** : 214-215.

[7] VIGNAIS PM, DIMON B, ZORIN NA, TOMIYANMA M & COLBEAU A (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 5997-6004.

[8] GARCIN E, VERNEDE X, HATCHIKIAN EC, VOLBEDA A, FREY M & FONTECILLA-CAMPS JC (1999) *Structure Fold* **7** : 557-566.

[9] PIERIK AJ, ROSEBOOOM W, HAPPE RP, BAGLEY KA & ALBRACHT SP (1999) *J. Biol. Chem.* **274** : 3331-3337 ;
GARCIN E, VERNEDE X, HATCHIKIAN EC, VOLBEDA A, FREY M & FONTECILLA-CAMPS JC (1999) *Structure Fold* **7** : 557-566.

[10] PETERS JW, LANZILOTTA WN, LEMON BJ & SEEFELDT LC (1998) *Science* **282** : 1853-1858 ;
NICOLET Y, PIRAS C, LEGRAND P, HATCHIKIAN EC & FONTECILLA-CAMPS JC (1999) *Structure* **7** : 13-23.

[11] GLOAGUEN F, LAWRENCE JD, SCHMIDT M, WILSON SR & RAUCHFUSS TB (2001) *J. Amer. Chem. Soc.* **123** : 12518-12527.

[12] VOORDOUW G (2000) *Biophys. Chem.* 86 : 131-140 ;
DUBINI A & SARGENT F (2003) *FEBS Lett.* **549** : 141-146.

[13] VIGNAIS PM, DIMON B, ZORIN NA, COLBEAU A & ELSEN S (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 290-292.

[14] RICHAUD P, COLBEAU A, TOUSSAINT B & VIGNAIS PM (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 5298-5392 ;
ELSEN S, COLBEAU A, CHABERT J & VIGNAIS PM (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 5174-5181 ;
ELSEN S, COLBEAU A & VIGNAIS PM (1996) *J. Bacteriol.* **179** : 968-971.

[15] ELSEN S, DUCHÉ O & COLBEAU A (2003) *J. Bacteriol.* **185** : 7111-7119.

[16] DISCHERT W, VIGNAIS PM & COLBEAU A (1999) *Mol. Microbiol.* **34** : 995-1006.

[17] ELSEN S, DISCHERT W, COLBEAU A & BAUER CE (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 2831-2837.

[18] Swem LR, Kraft BJ, Swem DL, Setterdahl AT, Masuda S, Knaff DB, Zalkeski JM & Bauer CE (2003) *EMBO J.* **22** : 4699-4708.

[19 Ljungdahl LG (1986) *Annu. Rev. Microbiol.* 40 : 415-450 ;
Ragsdale SW (1997) *Bio Factors* **9** : 1-9.

[20] Ma K, Siemon S & Diekert G (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* **43** : 367-371.

[21] Küsel K, Karnholz A, Trinkwalter T, Devereux R, Acker G & Drake HL (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 4734-4741.

[22] Karnholz A, Küsel K & Gößner A, Schramm A, Drake HL (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 1005-1009.

[23] Wellsbury P, Goodman K, Barth T, Cragg BA, Barnes SP & Parkes RJ (1997) *Nature* **388** : 573-576.

[24] Menon S & Ragsdale SW (1996) *Biochemistry* **35** : 15814-15821.

[25] Furdui C & Ragsdale SW (2000) J. *Biol. Chem.* **275** : 28494-28499.

[26] Menon S & Ragsdale SW (1999*) J. Biol. Chem.* **274** : 11513-11518.

[27] Menon S & Ragsdale SW (1998) *Biochemistry* **37** : 5689-5698.

[28] Doukov T, Seravalli J, Stezowski JJ & Ragsdale SW (2000) *Structure Fold Des.* **8** : 817-830.

[29] Seravalli J, Zhao S & Ragsdale SW (1999) *Biochemistry* **38** : 5715-5728.

[30] Kerby RL, Hong SS, Ensign SA, Coppoc LJ, Ludden PW & Roberts GP (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 5284-5294.

[31] Qiu D, Kumar M, Ragsdale SW & Spiro TG (1994) *Science* **264** : 817-819.

[32] Seravalli J, Gu W, Tam A, Strauss E, Cramer SP & Ragsdale SW (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** : 3689-3694.

[33] Roberts JR, Lu W-P & Ragsdale SM (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 4667-4676.

[34] DarnaultC, Volbeda A, Kim EJ, Legrand P, Vernede X, Lindahl PA & Fontecilla-Camps JC (2003) *Nat. Struct. Biol.* **10** : 271-279.

[35] Loke HK, Bennett GN & Lindahl PA (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** : 12530-12535.

[36] Gold T (1992) *Proc. Natl. Acad.* Sci. **89** : 6045-6049.

[37] Hackstein JH & Stumm CK (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (US) **91** : 5441-5445.

[38] Großkopf R, Janssen PH, Liesack W (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 960-969 ;
Großkopf R*,* Stubner S, Liesack W (1998) *Appl. Environ. Microbiol*. **64** : 4983-4989.

[39] W.S. Reeburgh & coll. (1991) *Deep Sea Res.* **38** : 1189-1210.
En Juillet 1996 s'est réunie à Istambul une première conférence internationale destinée à faire l'état des lieux et à proposer des mesures au niveau mondial.

[40] Bult CJ & coll. (1996) *Science* **273** : 1058-1073 ;
Smith DR & coll. (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 7135-7155.

[41] Blaut M & Gottschalk G (1985) *Trends Biochem.Sci.* **10** : 486-489 ;
Lancaster JR (1989) *J. Bioenerg. Biomembr.* **21** : 717-740.

[42] Ferry JG (1999) *FEMS Microbiol.Rev.* **23** : 13-38 ;
Schäfer G, Engelhard M & Müller V (1999) *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.* **63** : 1092-2172.

[43] Karrasch M, Borner G, Enssle M & Thauer RK (1990) *Eur. J. Biochem.* **394** : 167-172.

[44] THAUER RK (1998) *Microbiology* **144** : 2377-2406.

[45] CHISTOSERDOVA L, VORHOLT JA & THAUER RK, LIDSTROM ME (1998) *Science* **281** : 99-102.

[46] KUNOW J, SHIMA S, VORHOLT JA & THAUER RK (1996) *Arch. Microbiol.* **165** : 97-105.

[47] ERMLER U, MERCKEL M, THAUER R & SHIMA S (1997) *Structure* **5** : 635-646.

[48] ENSSLE M, ZIRNGIBL C, LINDER D, THAUER RK (1991) *Arch. Microbiol.* **155** : 483-490 ;
KLEIN AR, KOCH J, STETTER KO & THAUER RK (1993) *Arch. Microbiol.* **160** : 186-192.

[49] KLEIN AR & THAUER RK (1995) *Eur. J. Biochem.* **227** : 169-174.

[50] ZIRNGIBL C, VAN DONGEN W, SCHWORER B, VONBUNAU R, RICHTER M, KLEIN A & THAUER RK (1992) *Eur. J. Biochem.* **208** : 511-520.

[51] SCHWÖRER B, FERNANDEZ VM, ZIMGIBL C & THAUER RK (1993) *Eur. J. Biochem.***212** : 255-261 ;
THAUER RK, KLEIN AR & HARTMANN GC (1996) *Chem. Rev.* **96** : 3031-3042 ;
AFTING C, KREMMER E, BRUCKER C, HOCHEIMER A & THAUER RK (2000) *Arch. Microbiol.* **174** : 225-232.

[52] BROMMELSTROET BWJ, GEERTS WJ, KELTJENS JT, VANDERDRIFT C & VOGELS GD (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1079** : 293-302.

[53] BECHER B, MULLER V, GOTTSCHALK G (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 7656-7660 ;
GARTNER P, WEISS DS, HARMS U & THAUER RK (1994) *Eur .J. Biochem.* **226** : 465-472 ;
LIENARD T, BECHERB, MARSCHALL M, BOWIEN S & GOTTSCHALK G (1996) *Eur. J. Biochem.* **239** : 857-864.

[54] LIENARD T & GOTTSCHALK G (1998) *FEBS Lett.* **425** : 204-208.

[55] ROSPERT S, LINDER D, ELLERMANN J & THAUER RK (1990) *Eur. J. Biochem.* **194** : 871-877 ;
ERMLER U, GRABARSE W, SHINA S, GOUBEAUD M & THAUER RK (1997*) Science* **278** : 1457-1462.

[56] ABKEN HJ, TIETZE M, BRODERSEN J, BAÜMER S, BEIFUSS U, DEPPENMEIER U (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 2027-2032.

[57] DEPPENMEIR U,MÜLLER V & GOTTSCHALK G (1996) Arch. Microbiol. **165** : 149-163 ;
IDE T, BAÜMER S & DEPPENMEIR U (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 4076-4080.

[58] SIMIANU M, MURAKAMI E, BREWER M & RAGSDALE SW (1998) *Biochemistry* **37** : 10027-10039.

[59] BRODERSEN J, BAÜMER S, ABKEN HJ, GOTTSCHALK G & DEPPENMEIER U (1999) *Eur. J. Biochem.* **259** : 218-224.

[60] RUPPERT C, WIMMERS S, LEMKER T, MÜLLER V (1998) *J. Bacteriol*. **180** : 3448-3452.

[61] VAN BEELEN P, LABRO JF, KELTJENS JT, GEERTS WJ, VOGELS GD, LAARHOVEN WH, GUIJT W & HAASNOOT CA (1984) *Eur. J. Biochem.* **139** : 359-365.

[62] SHIEH J & WHITMAN WB (1988) *J. Bacteriol.* **170** : 3072-3079.

[63] OLSEN GJ & WOESE CR (1996) *Trends Genet.* **12** : 377-379 ;
HUBER C & WACHTERSHAUSER G (1997) *Science* 276 : 245-247.

[64] RAGSDALE SW (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2** : 208-215.

[65] GRAHAME DA (1991) *J. Biol. Chem.* **266** : 22227-22233 ;
GRAHAME DA & DE MOLL E (1991) *J. Biol. Chem.* 271 : 8352-8358 ;
MURAKAMI T & RAGSDALE SW (2000) *J. Biol. Chem.* **275** : 4699-4707.

[66] KRZYCKI JA, MORTENSON LE & PRINCE RC (1989) *J. Biol. Chem.* **264** : 7217-7221.

[67] KISKER C, SCHINDELIN H, ALBER BE, FERRY JG & REES DC (1996) *EMBO J.* **15** :2323-2330.

[68] Zengler K, Richnow HH, Rosselló-Mora R, Michaelis W & Widdel F (1999) *Nature* **401** : 266-269.

[69] Holliger C, Schraa G, Stupperich E, Stams AJM & Zehnder AJB (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 4427-4434.

[70] Lindmark DG & Müller M (1973) *J. Biol. Chem.* **248** : 7724-7728.

[71] Müller M (1993) *J. Gen. Microbiol.* **139** : 2879-2889.

[72] Lloyd D, Ralphs JR & Harris JC (2002) *Microbiology* **148**(Pt 3) : 727-733.

[73] Johnson PJ, d'Oliveira CE, Gorrell TE & Müller M (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87** : 6097-6101.

[74] Lahti CJ, D'Oliveira CE & Johnson PJ (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 6822-6830.

[75] Baroin-Tourancheau A, Delgado P, Perasso R & Aduotte A (1992) *Proc. Natl. cad. Sci.* **89** : 9764-9768 ;
Dyall SD & Johnson PJ (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* **3** : 404-411.

[76] Akhmanova A, Voncken F, van Alen T, van Hoek A, Boxma B, Vogels G, Veenhuis M & Hackstein JHP (1998) *Nature* **396** : 527-528.

CHAPITRE 5
AZOTE ET ANAÉROBIOSE

Le cycle de l'azote passe par des étapes essentielles qui sont l'azote atmosphérique, l'ammoniac et le nitrate. Les aspects essentiels développés ici sont l'assimilation du premier et la dénitrification qui réduit par étapes le nitrate en N_2. L'assimilation de N_2 n'est réalisée que par des procaryotes grâce à leur nitrogénase. La dénitrification fournit une part importante de l'énergie nécessaire au recyclage de la matière organique à l'abri de l'air. Elle met en jeu des outils spécifiques. L'alternance entre les conditions aérobies et anaérobies dans une même espèce bactérienne met en jeu des remaniements physiologiques importants qui sont évoqués à la fin de ce chapitre.

5 – Azote et anaérobiose

Les biodégradations et le recyclage de la matière organique dans la biosphère dépendent pour une part de la dénitrification. Ce procédé consiste à utiliser l'ion nitrate comme accepteur d'électrons en l'absence d'oxygène, et son intervention est considérable dans les biodégradations anaérobies. Le nitrate est une étape fondamentale du cycle de l'azote dans la nature, comme l'est l'azote atmosphérique. Le cycle de l'azote constitue donc un tout, sans lequel on ne pourrait pas comprendre bon nombre des transformations de la biosphère.

5.1 - Le cycle biologique de l'azote

Comparé au carbone, à l'oxygène et à l'hydrogène, l'azote est un constituant minoritaire des êtres vivants, mais il est tout aussi essentiel comme chacun sait. L'azote fait souvent partie des éléments limitants au cours de la croissance des plantes, sinon nul serait le besoin d'utiliser autant de fertilisants azotés dans l'agriculture. La biosphère est en contact avec deux grands réservoirs d'azote. Le premier est l'atmosphère, où N_2 est la principale forme (78%) conjointement à des composés mineurs tels que les oxydes d'azote et le gaz ammoniac. Le second est constitué par le sol et les océans **[1]**. L'azote est immobilisé en grande quantité dans des roches où il n'est pas mobilisable par les êtres vivants. Il y est très inégalement réparti, abondant sous forme de KNO_3 dans le salpêtre et de $NaNO_3$ dans les évaporites. Les nitrates du Chili proviennent notamment de l'important gisement de nitrate de sodium des hauts plateaux désertiques et secs de l'Altacama. L'ammonium existe en faible proportion dans les roches cristallines, où il peut remplacer le potassium des minéraux. Une teneur en azote relativement élevée (200 à 4000 ppm) s'observe dans le granite et résulte sans doute de l'assimilation de roches sédimentaires au cours de l'intrusion du magma. La quantité d'azote logé dans les roches sédimentaires, majoritairement sous forme organique, atteindrait 10^{15} tonnes, principalement dans les schistes et pétroles, et le sol végétal superficiel ne contiendrait finalement qu'une part très minime de l'azote terrestre. La teneur en azote d'un sol est évidemment très variable. Elle oscille couramment autour de 5% en poids de N, principalement sous forme organique.

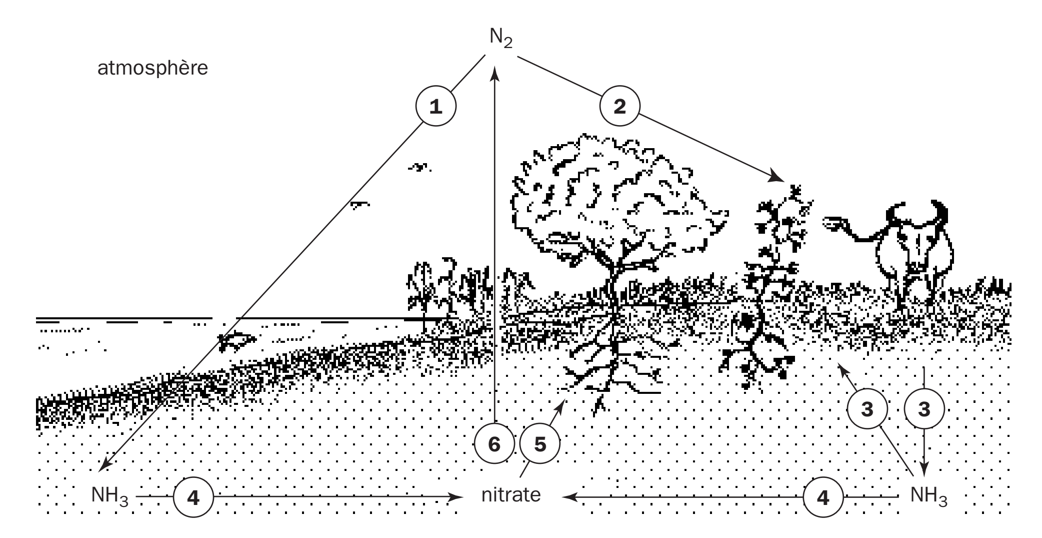
L'azote directement assimilable par les êtres vivants pour leurs synthèses doit se trouver sous forme ammoniacale, c'est-à-dire à l'état le plus réduit. C'est sous cette forme qu'il sera intégré dans les acides aminés et autres matériaux de base. Le tableau est un petit aide-mémoire pour ces voies d'entrée :

Enzyme	Principe réactionnel
Glutamate déshydrogénase*	2-oxoglutarate + NH_3 + NAD(P)H, H^+ $\rightleftharpoons$ L-Glutamate + $NADP^+$ + H_2O
Aminotransférases*	L-Glutamate + 2-oxoacide $\rightleftharpoons$ 2-oxoglutarate + acide aminé
Glutamine synthétase*	L-Glutamate + NH_3 + ATP $\rightarrow$ L-Glutamine + ADP + phosphate
Glutamate synthase*	L-Glutamine + 2-oxoglutarate + NAD(P)H, H^+ $\rightleftharpoons$ 2 L-Glutamate + $NADP^+$

Pour de très nombreuses espèces bactériennes, les ions ammonium offrent la source azotée la plus favorable à la croissance. On observe également que sur un milieu riche en ammonium, la synthèse des enzymes qui permettraient l'utilisation d'autres sources azotées est souvent réprimée. L'activité de la glutamine synthétase est essentielle à l'assimilation azotée quand le milieu est pauvre en ammonium, mais elle est à son niveau le plus bas si le milieu est riche en azote ammoniacal. La glutamine sert à la fois d'acide aminé pour la construction des protéines et comme donneur d'azote dans des synthèses de constituants cellulaires aussi essentiels que les bases des acides nucléiques L'activité de l'enzyme est donc généralement contrôlée en fonction du taux d'ammonium disponible, de façon qu'il y ait toujours suffisamment de glutamine pour le métabolisme. Tandis que le taux de glutamine synthétase est à son minimum en excès de source azotée, une deuxième voie d'entrée par la glutamate déshydrogénase devient prépondérante. Inversement une disette en azote entraîne une montée de la glutamine synthétase, dont le produite engendre du glutamate par le jeu de la glutamate synthase. Or l'azote des constituants organiques cellulaire vient du glutamate pour environ 85% !

Le cycle de l'azote dans la biosphère est représenté sur le schéma suivant sous une forme très simplifiée dictée par les seuls objectifs immédiats de l'environnement. La quantité globale d'azote est réglée par les apports provenant surtout de l'atmosphère, et par les pertes dues aux émissions de gaz (N_2, N_2O, NH_3 et composés mineurs). L'activité humaine perturbe cet équilibre par l'usage des fertilisants, la déforestation, la combustion des carburants fossiles et diverses pollutions.

On sait que le **nitrate** est la source azotée préférée des végétaux, car il est véhiculé des racines aux parties aériennes et facilement réduit en ammoniac par le pouvoir réducteur né de la photosynthèse. Certaines plantes utilisent aussi l'ammonium, en particulier des essences forestières quand l'acidité du sol nuit à la nitrification **[2]**. La présence de la microflore autour des racines (rhizosphère) est à prendre en compte dans tous les cas de figure. Le nitrate ne concerne pas que les végétaux terrestres. Sa répartition a une grande importance dans la biologie des océans à la faveur des migrations du phytoplancton. Des études ont montré que des organismes tributaires de la photosynthèse comme les diatomées (*Rhizosolenia*) peuvent effectuer des migrations verticales alternées à travers la *nitracline**, entre la surface pauvre en azote et les zones profondes plus riches en azote, en phosphates et en matières carbonées **[3]**. Il en résulte un apport azoté à la surface de vastes zones océaniques.



① Assimilation de N_2 par bactéries non symbiotiques, phototrophes, cyanobactéries
② Assimilation symbiotique de N_2 par bactéries des nodules ou au niveau des tiges
③ Décompositions animales et végétales, interconversions au niveau de la microflore
④ Nitrification (en plusieurs étapes) par des chimio-lithotrophes
⑤ Assimilation du nitrate par les plantes et les micro-organismes
⑥ Dénitrification en oxydes d'azote, N_2 étant le stade final

Cycle de l'azote

La biosphère s'appauvrirait en azote sans une recharge à partir de l'atmosphère. La réduction de N_2 en ammoniac est l'exclusivité absolue des procaryotes vivant dans le sol, les océans ou en symbiose avec des plantes. L'enzyme clé est la **nitrogénase**. Les cyanobactéries unicellulaires ou filamenteuses du nanoplancton océanique (*Trichodesmium*, *Richelia*) apporteraient une contribution autrefois insoupçonnée dans l'économie azotée de la vie sur la planète **[4]**. La fixation de l'azote en milieu continental est réalisée aussi par de nombreuses cyanobactéries et des organismes qui ne sont pas tous phototrophes. Certaines bactéries vivent à l'état libre (type *Azotobacter*), d'autres sont symbiotiques comme les *Rhizobium* et *Frankia*. Ce flux d'entrée dans les sols et les eaux compense, au moins en partie, les pertes dues à la dénitrification. Celle-ci est catalysée par les bactéries en respiration anaérobie, change le nitrate en nitrite puis en oxydes (NO, N_2O), et enfin en N_2. Il en sera question plus loin dans ce chapitre.

Dans les conditions naturelles la charge totale de l'azote du sol crée des conditions limitantes. L'azote y est représenté en majorité (autour de 80%) par des résidus organiques provenant de la décomposion des matières animales et végétales. L'azote disponible est donc de première importance non seulement pour l'agriculture mais dans les recyclages nombreux et variés que les micro-organismes sont amenés à pratiquer. Les techniques d'assolement de l'agriculture traditionnelle utilisent comme "engrais vert" les plantes fixatrices d'azote comme le trèfle ou la luzerne. Un équivalent existe dans la culture du riz, grâce aux petites fougères du genre *Azolla* porteuses de cyanobactéries assimilatrices d'azote.

La recherche de productivité à outrance ne se contente plus des anciennes techniques agricoles et a recours massivement aux engrais, notamment aux nitrates. L'emploi de ces derniers à grande échelle crée les problèmes d'environnement qu'on sait. Les nitrates en excès sont facilement entraînés jusque dans les aquifères et les cours d'eau, où leur teneur peut dépasser largement les taux acceptables, soit 50 $mg \cdot L^{-1}$ pour les nitrates, 0,1 $mg \cdot L^{-1}$ pour les nitrites. L'apport des nitrates dans les eaux côtières est responsable des "marées vertes" constatées depuis quelques années à l'embouchure de plusieurs rivières armoricaines, différentes formes d'eutrophisation accompagnent la prolifération d'algues vertes (ulves) et du phytoplancton contenant des espèces toxiques (*Alexandrium minutum*). L'excès de nitrate a aussi l'inconvénient d'exacerber la dénitrification génératrice d'oxydes d'azote comme l'oxyde nitreux (N_2O), qui est un gaz à effet de serre. Peu réactif, sa durée de vie dans l'atmosphère est très longue et crée au niveau de la stratosphère des réactions secondaires destructrices de la couche d'ozone. L'effet d'un autre produit, l'oxyde nitrique (NO) est au contraire de contribuer à la formation d'ozone, non pas à très haute altitude mais dans la troposphère, par une réaction photochimique utilisant aussi les hydrocarbures et les gaz d'échappement émis par la circulation automobile.

L'accroissement continuel de la population du globe devrait s'accompagner d'une augmentation de la production agricole et de l'élevage. Le recours à des engrais azotés peut sembler inéluctable, mais le développement de nouvelles techniques agricoles (culture bio, culture raisonnée) s'efforcent d'y remédier et de limiter la pollution par les nitrates. Des experts ont calculé que l'emploi d'engrais vert et de fumier animal permet d'espérer un apport annuel de 200 kg d'azote par hectare de terre arable, et de nourrir 15 personnes dans les conditions les plus favorables possibles. Le chiffre est en réalité inférieur, à cause de l'utilisation de fourrage, de la culture de plantes non destinées à l'alimentation, des incidences climatiques… Le recours aux engrais azotés artificiels est parfois nécessaire, notamment dans les pays en voie de développement. L'histoire retiendra sans doute la découverte de la synthèse de l'ammoniac par le procédé HABER-BOSCH, comme une percée technique majeure faite à l'orée du XXème siècle. L'économie azotée de l'environnement n'a pas que des incidences sur l'agriculture. Ses répercussions sont nombreuses et complexes sur la microflore, l'activité des biodégradations et des recyclages divers concernant aussi bien les déchets naturels que les pollutions de source humaine. Cela sera la toile de fond de cette introduction.

5.2 - CEUX QUI ASSIMILENT L'AZOTE

L'air que nous respirons représente pour la biosphère un colossal réservoir d'azote. L'entrée de l'azote ou dinitrogène (N_2) chez les êtres vivants a des incidences profondes sur l'environnement, car elle est une phase clé du cycle de l'azote. On ne peut la disjoindre du problème général des biodégradations, car beaucoup de germes assimilateurs contribuent aux équilibres naturels et participent directement ou indirectement à des transformations diverses. Elle encourage le développement

de la vie dans des régions arides ou sur des sols très pauvres qui sont éventuellement contaminés par les rejets de l'activité humaine. On se contentera ici de repères assez succincts. Pour bien comprendre les contraintes biologiques sévères de la fixation de N_2, il convient de se rappeler les éléments suivants. La nitrogénase est une enzyme procaryotique et cytoplasmique. Elle catalyse la réaction :

$$N_2 + 8\,e^- + 8\,H^+ + n\,ATP \longrightarrow 2\,NH_3 + H_2 + n\,ADP + n\,P_i$$

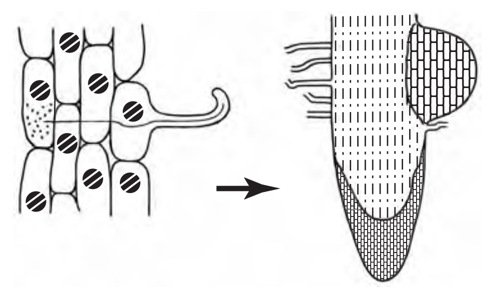
La réduction d'une molécule de N_2 est irréversible et nécessite 8 électrons. Elle ne produit pas que de l'ammoniac (ou des ions ammonium) mais génère aussi de l'hydrogène et hydrolyse de l'ATP à raison d'au moins 2 molécules par électron (n est égal au minimum à 16). L'enzyme est donc extraordinairement gourmande en énergie. En outre la source d'électrons exigée est à bas potentiel, le plus souvent une ferrédoxine réduite. Enfin une dernière contrainte est de taille, car l'enzyme est immédiatement inactivée par O_2. On en déduit que l'assimilation de l'azote ne peut se faire que dans un environnement sans oxygène. Par des espèces anaérobies ? Pas nécessairement, si l'oxygène n'est présent qu'au compte-goutte ou s'il est consommé si rapidement à la surface de la cellule qu'il n'a pas le temps de diffuser jusqu'à la nitrogénase. Les organismes assimilateurs de N_2 sont des eubactéries et archaebactéries procaryotes répartis dans plus de 100 genres. Certains fixent l'azote en vivant à l'état libre, d'autres le font au cours d'une symbiose.

Quels sont les organismes de la première catégorie ? On y rencontre des anaérobies stricts comme *Clostridium pasteurianum*, bactéries tirant leur énergie de fermentations variées et sophistiquées, et communes dans les matières végétales en décomposition. Des anaéorobies facultatifs font partie des γ-protéobactéries (le groupe où se situe le colibacille). *Klebsiella aerogenes* et *K. oxytoca* sont des fixateurs d'azote très étudiés. On peut citer des espèces aérobies appartenant aux γ-protéobactéries (*Azotobacter chroococcum* et *Az. vinelandii*), et des α-protéobactéries souvent présentes dans la rhizosphère des plantes : *Azospirillum brazilense*, *Azospirillum lipoferum*. Les fixateurs d'azote sont également nombreux chez les phototrophes non oxygéniques comme *Rhodobacter capsulatus* et *Rodospirillum rubrum*, ou parmi les cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*). Diverses espèces bactériennes spécialisées se rencontrent ici et là dans la taxonomie (*Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*). Ils convient de citer enfin divers méthanogènes, comme *Methanococcus maripaludis* ou *Methanosarcina barkeri*.

Une espèce très étudiée est *Azospirillum brasilense*, car ce germe Gram-négatif colonise les rhizosphères de plantes telles que les céréales cultivées et diverses monocotylédones tropicales. Cette espèce versatile peut croître en aérobiose, anaérobiose où dans les conditions micro-aérophiles compatibles avec la fixation de N_2 et réalisées dans les rhizosphères. En l'absence d'air, les bactéries peuvent tirer leur énergie de la dénitrification (section 5) **[5]**. À faible concentration d'oxygène, une oxydase respiratoire puissante de type cytochrome cbb_3 leur fournit l'énergie nécessaire à la fixation de l'azote **[6]**. De façon générale, la fixation de l'azote en présence d'O_2 exige des adaptations particulières. *Aerobacter* peut tolérer une teneur assez forte en oxygène parce que les oxydations respiratoires de ces bactéries sont assez rapides pour l'éponger avant qu'il n'atteigne la nitrogénase. Les cyanobactéries fixatrices de N_2 sont confrontées à un problème

particulièrement critique puisque leur photosynthèse fabrique du dioxygène. Elles y font face par des adaptations physiologiques spéciales. L'une d'elles consiste à cantonner l'assimilation de l'azote à des cellules spéciales (hétérocystes), où la production d'O_2 par le PS2 est mise en veilleuse. L'autre solution consiste à faire fonctionner la photosynthèse et l'assimilation en alternance.

La seconde catégorie des organismes fixateurs concerne des symbioses avec des plantes ou des champignons. Trois situations différentes sont représentées par les *Rhizobium* et organismes de la même famille, les *Frankia*, et les cyanobactéries dans les lichens.



Cortex de la racine *Nodule en formation*

Les *Rhizobium* et organismes voisins colonisent typiquement les racines de plantes légumineuses herbacées (fève, luzerne) ou ligneuses (robiniers, acacias). Les bactéries pénètrent les racines par les poils absorbants et provoquent la formation de nodules dans lesquels elles subissent une transformation en bactéroïdes.

Les germes sont attirés par des substances flavonoïdes émises par la plante. Ils répondent par un signal chimique que la plante reconnaît à l'aide d'une *lectine**[1]. Les deux partenaires se modifient mutuellement au cours de la symbiose. Les cellules bactériennes entrent par un poil absorbant, perdent leur membrane externe et changent de forme, tout en produisant une cytokinine (sorte d'hormone de croissance).

L'entrée des bactéries est à l'origine d'une tumorisation locale conduisant à la formation d'un nodule. Celui-ci peut se comparer à une galle, une réaction de défense à l'invasion étrangère. Les cellules bactériennes de leur côté sont assez profondément modifiées par la nouvelle situation. Enfermées dans une vacuole, elles subissent un remaniement important qui les conduit à exploiter les facilités apportées par le végétal. Mais elles sont destinées à dégénérer et à disparaître sous l'effet des défenses de la plante. Le principe de cette association est donc fort complexe. Cette symbiose tient à la fois de l'infection, du parasitisme, de réactions de défense et d'un équilibre assez étonnant entre des échanges métaboliques qu'on pourrait considérer comme des bénéfices mutuels. Il y a induction de la nitrogénase, réduction de N_2 et apparition de divers caractères biochimiques qui autoriseront des échanges de composés organiques avec l'hôte. Les bactéroïdes ont besoin de beaucoup d'énergie qu'ils tirent d'oxydations par l'oxygène, et reçoivent celui-ci de la plante qui fabrique au niveau des nodules une protéine fixatrice de O_2, la **leghémoglobine**. Celle-ci est une hémoprotéine analogue à l'hémoglobine de notre sang. Elle capte l'oxygène avec une très haute affinité, et le distille

---

1 - *Un tétrasaccharide sulfaté et porteur d'une chaîne hydrophobe, qui fonctionne en quelque sorte comme une clé de sûreté reconnue par la serrure (la lectine).*

en petite quantité aux bactéroïdes **[7]** selon un dosage critique préservant l'intégrité de la nitrogénase. Chose curieuse, les bactéroïdes ne sont pas capables de fabriquer par eux-mêmes des molécules azotées à partir de l'ammonium qu'ils produisent. C'est la plante qui récupère l'ammonium, et les bactéroïdes recevront en retour du glutamate et des substrats carbonés comme le malate et le fumarate. L'association symbiotique est généralement très spécifique, chaque souche n'infectant qu'une espèce de plante ou une gamme très limitée d'hôtes. Un thème de recherche important consiste à sélectionner des souches capables de s'associer avec une gamme de plantes cultivées plus étendue.

Les *Frankia* sont des bactéries du sol organisées en filaments pluricellulaires ou hyphes et appartenant au groupe des actinomycétales. La symbiose s'effectue avec de nombreuses espèces végétales, souvent des arbres et arbustes croissant sur des terrains arides ou extrêmement pauvres, soit pas moins de 200 dicotylédones appartenant à 25 genres et 8 familles différentes **[8]**. Citons les aulnes (*Alnus*), les filaos (*Casuarina*, *Allocasuarina*), l'argousier (*Hyppophae*), l'olivier de Bohême (*Elaeagnus angustifolia*), les *Myrica* et diverses Rosacées comme les *Dryas*. Les bactéries pénètrent les racines à la façon des *Rhizobium*, mais leur nodulation des racines est différente. Le germe s'y propage dans la zone corticale, produit des sporanges et des spores, ainsi que des vésicules servant de réservoir à la nitrogénase. La spécificité d'hôte est moins stricte que pour les *Rhizobium*. Contrairement à ces derniers, les *Frankia* exportent des aminoacides vers la plante plutôt que l'ammonium. La symbiose par les *Frankia* autorise la conquête naturelle des terrains difficiles, et offre de nombreuses applications pour l'aménagement du territoire. Elles concernent le reboisement, la résistance au sel, au feu, à la pollution. Comme exemples simples, les aulnes (*A. incana*) colonisent les moraines et éboulis des montagnes alpines, les filaos diversifiés dans les pays chauds sont les pionniers des dunes, des éboulis des zones semi-arides et des environnements dont les ressources sont spartiates. Une recherche systématique des espèces végétales concernées est facilitée par l'amplification de fragments d'ADN (technique PCR) et l'emploi de sondes spécifiques, une méthodologie qui a été pratiquée par exemple en France à l'Université de Lyon **[9]**. En fait, même si les arbres tirent bénéfice de leur *Frankia*, l'invasion de celui-ci ressemble, comme pour les *Rhizobium*, à un mécanisme infectieux. On en veut pour preuve le taux très élevé de superoxyde dismutase chez les *Frankia* **[10]**. Pourquoi ? Lorsqu'une plante est attaquée par un agent infectieux, elle tente de s'en protéger par l'émission de superoxyde et de peroxyde **[11]**. *Frankia* déclenche cette réaction, mais possède les défenses pour y faire face.

Les **cyanobactéries** vivent en association avec des champignons dans certains lichens ou avec des fougères aquatiques (*Azolla*) dans les rizières [2]. Les **lichens** représentent comme on le sait une association symbiotique particulièrement poussée entre un champignon ascomycète et un organisme chlorophyllien qui est selon

---

2 - L'association avec Azolla est permanente, dans des lobes latéraux des feuilles de fougère. Les cyanobactéries (Anabaena) assimilent l'azote dans leurs hétérocystes. Il y a parfois un troisième larron, qui est un Arthrobacter.

les espèces soit une algue verte du type *Trebouxia*, soit une cyanobactérie (souvent un *Nostoc*). Seuls les lichens renfermant un partenaire cyanobactérien sont susceptibles d'assimiler directement N_2. Le champignon confère au lichen sa morphologie, enveloppe son partenaire phototrophe qui est confiné dans certaines zones du thalle, le protège contre la dessiccation, fournit des éléments nutritifs et des minéraux. Il bénéficie en retour des produits carbonés de la photosynthèse, du glucose par les cyanobactéries ou des polyols (mannitol, ribitol) par les algues. Les lichens sont par essence des organismes pionniers. On a souvent décrit leur sensibilité à la pollution atmosphérique des villes, notamment par le dioxyde de soufre. Malheureusement on connaît mal leur pouvoir de décontamination. La lenteur extrême de leur développement et la difficulté qu'il y a de les étudier par les méthodes standards de la microbiologie ne facilitent pas les recherches. Certaines usnées peuvent avoir un développement relativement rapide, mais des lichens comme ceux qui tapissent les rochers ont une croissance atteignant péniblement 1 mm par an. Parmi les nombreux lichens observés dans l'Antarctique certains pourraient être vieux de plusieurs milliers d'années !

L'enzyme qui fixe l'azote est une sorte de petit miracle biologique. Nous avons vu que la nitrogénase est purement procaryotique, qu'elle réduit N_2 en ammoniac à grand renfort d'une dépense d'énergie sous forme d'ATP, et qu'elle fabrique en même temps de l'hydrogène. Le travail de la nitrogénase coûte cher à la cellule, qui a donc intérêt à ne l'utiliser que lorsqu'elle est vraiment nécessaire. La bonne marche de cette assimilation de l'azote obéit à trois conditions. La première est une source d'énergie suffisante. Chez les bactéries phototrophes ou les cyanobactéries, l'énergie est apportée par la lumière et la machinerie photosynthétique. Les autres espèces se servent de diverses oxydations pour produire cette énergie. La deuxième condition est l'absence de molécules azotées minérales ou organiques dans le milieu, car dans le cas contraire le fonctionnement de la nitrogénase serait inutilement dispendieux. Il y a donc des systèmes régulateurs qui limitent la synthèse de l'enzyme ou son fonctionnement. La troisième condition est l'absence de O_2 au contact de la nitrogénase. En effet l'oxygène inactive vigoureusement l'enzyme, qui ne peut fonctionner théoriquement qu'en anaérobiose complète. C'est pourquoi une chaîne respiratoire efficace a un rôle protecteur en épongeant les molécules d'oxygène, comme il a été idiqué antérieurement.

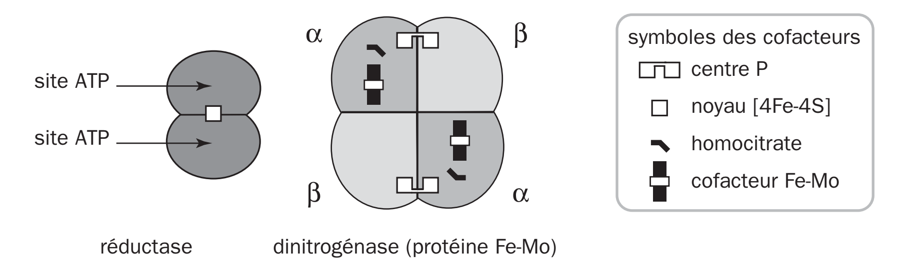
La section suivante passe rapidement en revue les différents aspects de cette question, si fondamentale pour l'équilibre de la biosphère que sans l'assimilation de N_2 les réservoirs azoté du monde vivant viendraient certainement à s'épuiser.

5.3 - LA NITROGÉNASE

La nitrogénase est bien une sorte de miracle puisqu'elle réalise dans des conditions physiologiques ordinaires une opération qui n'est réalisée dans l'industrie que sous hautes pression et température. Les connaissances sur la nitrogénase ont fortement progressé à la suite de l'analyse génétique et des travaux cristallographiques, dont les premiers ont porté sur l'enzyme à molybdène d'*Azotobacter*

vinelandii, puis sur celle de *Clostridium pasteurianum* **[12]**. L'azote n'est pas le seul substrat de l'enzyme, qui réduit aussi l'oxyde nitreux (N_2O), les ions cyanure, cyanate, thiocyanate, azoture, et surtout l'**acétylène**, qui offre un moyen de dosage par chromatographie en phase gazeuse. La nitrogénase d'*A. vinelandii* réduit le sulfure de carbonyle (COS) en CO + H_2S. Dans ce cas particulier, le monoxyde de carbone formé est un inhibiteur de l'enzyme, et pour obtenir et mesurer la réaction, il est nécessaire d'éliminer au fur et à mesure le CO en le fixant par l'hémoglobine. Le changement spectral dû à la formation de la carboxyhémoglobine sert alors à mesurer la réaction, freinée par l'acétylène et N_2, alors qu'il n'y a pas d'inhibition par l'hydrogène **[13]**.

La nitrogénase a toujours une structure complexe constituée de deux parties contenant l'une et l'autre des centres fer-soufre. Dans le type courant la plus grosse (240 kDa environ), ou dinitrogénase, est un tétramère $\alpha_2\beta_2$ renfermant du **fer** et du **molybdène**. On la désigne parfois comme *protéine Fe-Mo*. La réduction de N_2 se fait sur cette portion. La plus petite des deux parties (60 kDa) est la "dinitrogénase réductase", un dimère ne contenant qu'un seul centre fer-soufre. *A. vinelandii* et d'autres espèces renferment aussi deux dinitrogénases supplémentaires, dont l'une contient du **vanadium** à la place du molybdène, et une enzyme dite "*alternative nitrogenase*" ou nitrogénase de remplacement, dépourvue à la fois de Mo et de V qui sont remplacés par Fe. Les deux parties, réductase et dinitrogénase, sont remarquables par la batterie de cofacteurs qu'elles renferment. La structure constituée de deux parties semblables est symbolisée par un diagramme :

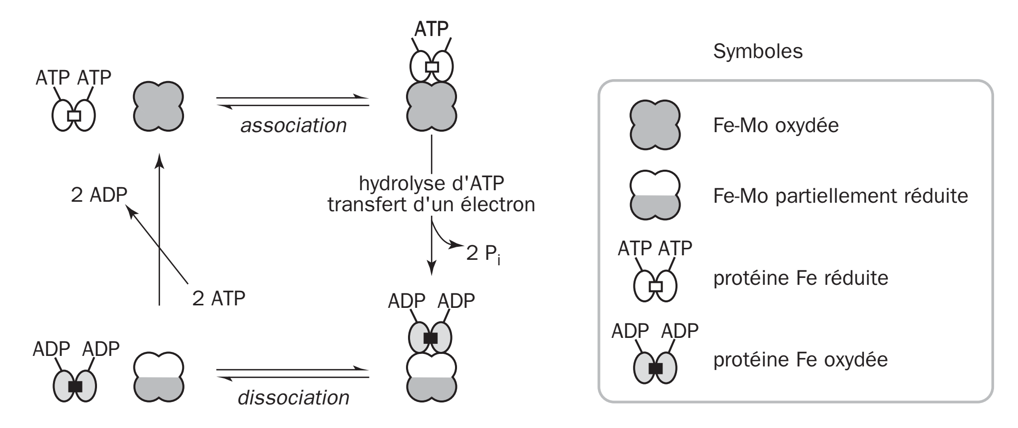


Les deux parties de la nitrogénase

La **réductase** munie de son centre fer-soufre unique de type [4Fe-4S] reçoit des électrons un à un par un donneur qui est soit une ferrédoxine ou une flavodoxine. Ces petites protéines ne font que servir d'intermédiaires entre une source de départ (oxydations du métabolisme, photosynthèse) et la réductase. Cette dernière s'associe à la dinitrogénase (la protéine Fe-Mo) et décharge sur elle chaque électron un par un au prix de l'hydrolyse de 2 ATP. Pour réduire une molécule de N_2, la dinitrogénase doit donc recevoir un total d'au moins 6 électrons, et même 8 en comptant la formation de la molécule d'hydrogène. La réduction a lieu sur le **noyau Fe-Mo**, cofacteur spécial qui est une sorte de double noyau fer-soufre contenant du molybdène. C'est une exception dans la nature car toutes les autres enzymes contenant cet élément le renferment dans un cofacteur de type nucléotidique. L'enzyme contient aussi des centres fer-soufre doubles, sans molybdène, appelés

centres P. Enfin un constituant organique, l'**homocitrate**, est relié au noyau Fe-Mo et paraît participer aux transferts d'électrons et de protons.

Pourquoi faut-il autant d'énergie pour le fonctionnement de la nitrogénase ? Le passage de N_2 à NH_3 implique 3 étapes de 2 électrons chacune, produisant N_2H_2 (un intermédiaire très instable qui tend à se décomposer en $N_2 + H_2$), puis $H_2N–NH_2$ (l'hydrazine), enfin l'ammoniac. L'étape la plus difficile est la première, car elle nécessite une réduction sous un potentiel extrêmement bas de l'ordre de – 600 mV pour un électron échangé, une valeur assez peu physiologique, alors que le potentiel de la réductase au repos est estimé à E'° = – 290 mV. La liaison de la protéine avec 2 ATP-Mg est facilitée quand elle est à l'état réduit, elle provoque une contraction de la structure et abaisse ce potentiel à environ – 400 mV. Comment ? Certainement à la faveur d'un changement de conformation de la protéine, qui devient un meilleur donneur d'électron quand elle est réduite. Les deux molécules d'ATP sont fixées par un mécanisme coopératif en des sites relativement éloignés du noyau fer-soufre. Leur hydrolyse renforce le changement structural et rend donc la protéine plus facilement réductrice. L'abaissement du potentiel est compensé par l'énergie d'hydrolyse de l'ATP, soit une valeur 32 kJ par mole à l'état standard, et une chute du potentiel de 330 mV, soit 660 mV pour 2 ATP. Un très bas potentiel est alors atteint, de l'ordre de – 1000 mV, une valeur suffisante pour l'injection d'un seul électron sur la dinitrogénase. Le transfert s'accompagne du changement de conformation inverse, de la libération de l'ADP et du phosphate, et d'un retour aux conditions initiales.

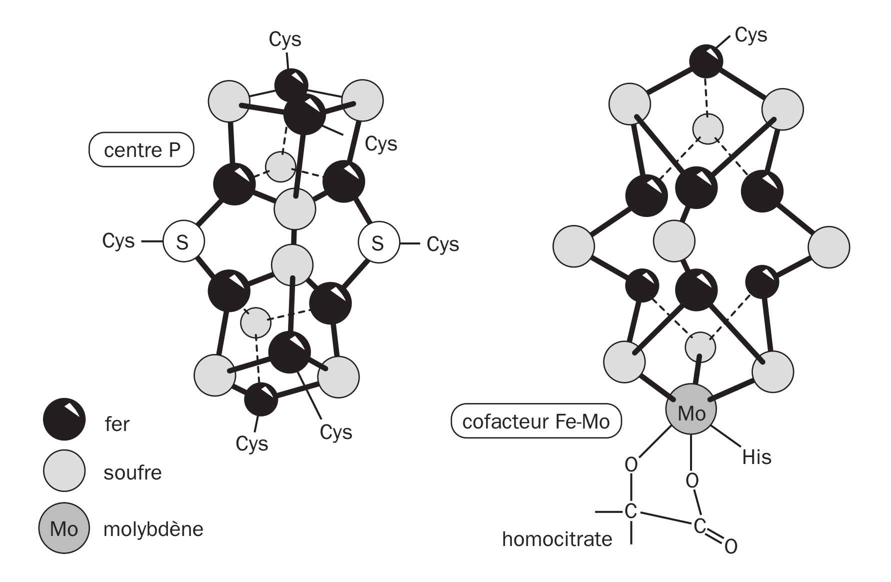


En résumé, le cycle de la dinitrogénase réductase comporte successivement une réduction par ferrédoxine sur son unique noyau [4Fe-4S], la liaison coopérative avec deux molécules d'ATP, l'association de la réductase avec la dinitrogénase (protéine Fe-Mo), l'hydrolyse des deux molécules d'ATP, l'injection d'un électron à la dinitrogénase et le retour aux conditions initiales. Un tel cycle est donc parcouru 8 fois La suite des opérations est symbolisée par un diagramme qui ressemble à un cycle d'hystérésis parcouru dans le sens des aiguilles d'une montre. pour qu'une seule molécule d'azote diatomique soit assimilée[3].

La réductase utilise ici l'hydrolyse d'ATP comme une impulsion supplémentaire, rendant le noyau fer-soufre plus réducteur et facilitant l'apport d'un électron à la

protéine Fe-Mo . La suite des opérations est symbolisée par un diagramme qui ressemble à un cycle d'hystérésis parcouru dans le sens des aiguilles d'une montre.

Il apparaît que le noyau fer-soufre de la réductase vient à proximité immédiate d'un cofacteur accepteur sur la Fe-Mo, probablement un centre P. En fait la protéine Fe-Mo , constituée de deux parties équivalentes, peut théoriquement recevoir deux molécules de réductase. Les **noyaux P** et **Fe-Mo** de la dinitrogénase ont des structures particulières, longtemps demeurées mystérieuse mais éclairées par les travaux cristallographiques. Ce sont des centres fer-soufre doubles de structure inhabituelle et pontés par des atomes de soufre.



La spectroscopie RPE suggère que le cofacteur Fe-Mo, dont on voit la structure hypothétique sur le dessin à droite, renferme l'équivalent de 3 Fe(III) et 4 Fe(II), joints à Mo(VI). L'architecture très spéciale de ces différents noyaux intrigue les spécialistes, qui y voient une structure très souple en cage déformable. Il faut reconnaître qu'il y a comme un caractère magique dans cette enzyme, à la fois par sa complexité et la difficulté de la réaction catalysée. Le rêve serait de réaliser des catalyseurs artificiels fonctionnant dans l'industrie sur un principe analogue !

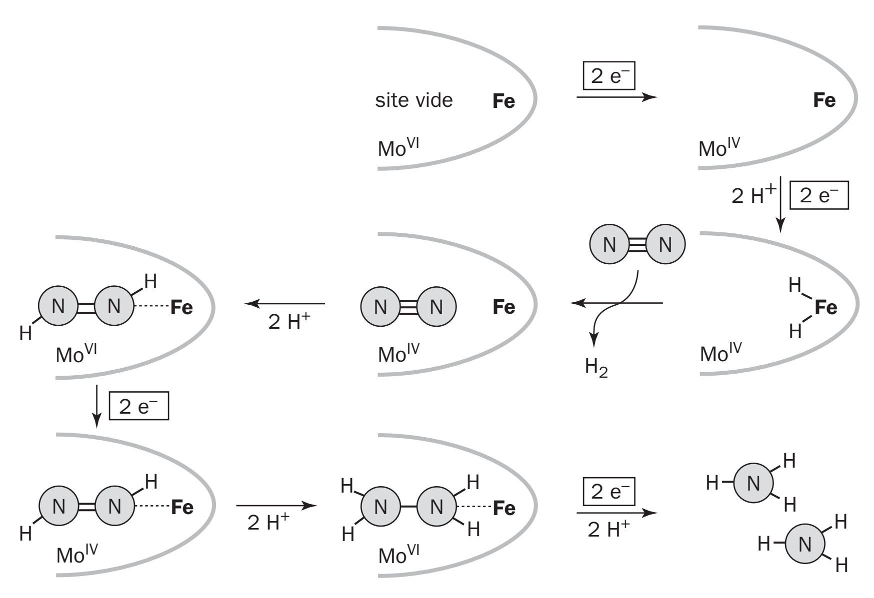
On connaît des nitrogénases sans molybdène. Les enzymes "V" d'*Azotobacter vinelandii* et d'*A. chroococcum* ont du **vanadium**. Un cofacteur Fe-V remplace donc le Fe-Mo, avec une organisation du même type. Les enzymes "Fe" de *A. vinelandii*, *Rhodobacter capsulatus* et *Rhodospirillum rubrum* n'ont que du **fer** dans un cofacteur Fe-Fe, où le fer remplace le molybdène ou le vanadium. Ces enzymes ne semblent pas très différentes de la nitrogénase à molybdène par leur organisation générale. Les trois catégories d'enzyme correspondent à des ensembles génétiques désignés dans la nomenclature officielle par *nif*, *vnf*, *anf*. L'existence de ces différentes nitrogénases suggère que la présence du molybdène dans le noyau complexe où se fait la réduction de N_2 n'est pas requise. Quelle explication donner à cette multiplicité ? On observe que la présence de Mo à taux très faible dans le

milieu (6 nM) réprime la synthèse des autres nitrogénases chez *Rhodobacter* et *A. vinelandii*. L'enzyme à molybdène pourrait s'avérer avantageuse. Une étude détaillée de la nitrogénase à fer seul dans *Rhodobacter capsulatus* révèle quelques différences significatives **[14]**. Par exemple pour chaque N_2 réduit, cette nitrogénase fait environ 7,5 molécules de H_2 au lieu d'une seule pour l'enzyme à Mo. Cette forte production d'hydrogène est moins inhibée par d'autres substrats, l'affinité pour l'acétylène est plus faible, l'enzyme est moins stable et diffère par un certain nombre de propriétés cinétiques. La raison physiologique de ces nitrogénases multiples dans une même espèce reste encore inexpliquée.

Revenons à l'**enzyme Mo** "canonique". Les idées de base sur le mécanisme de la nitrogénase ont été posées par le modèle de LOWE et THORNELEY, fondé sur des études cinétiques très détaillées **[15]**. Les deux moitiés $\alpha\beta$ de la dinitrogénase fonctionneraient indépendamment. Chaque cofacteur Fe-Mo sur α apparaît comme le site le plus probable de la réduction de l'azote. Il est attaché de façon assez lâche à la protéine et comporte une cavité centrale qui pourrait être à géométrie variable, formant une sorte de boîte élastique dont l'intérieur est tapissé par du fer et du molybdène. L'azote diatomique pourrait venir s'y loger, mais cette hypothèse est combattue par certains auteurs. Un fait essentiel est le couplage nécessaire entre la production d'hydrogène et la réduction de N_2. Il n'a jamais été possible d'observer une assimilation d'azote sans production de H_2. Le rapport entre H_2 formé et N_2 réduit est d'environ 1 : 1, mais une incertitude subsiste. Lorsque le transfert des électrons sur la protéine Fe-Mo s'effectue lentement, la tendance serait de libérer davantage d'hydrogène, comme une sorte de fuite détournant le pouvoir réducteur de la production d'ammoniac. L'enzyme se comporte alors comme une hydrogénase formant H_2 dans des conditions spéciales, puisqu'il y a en même temps hydrolyse d'ATP. Il est donc à peu près certain que le couplage entre production d'hydrogène et réduction de l'azote ne se fait pas toujours dans un rapport rigoureux. Dans les conditions normales, la nitrogénase à molybdène utilise 75% des électrons à la réduction de N_2. Pour les nitrogénases à vanadium, le rapport est de 50% environ, et il est encore plus bas pour les nitrogénases à Fe seul : 25-30% seulement.

Les bactéries devraient tirer un bénéfice de l'hydrogène produit par la nitrogénase. En effet l'hydrogène est un excellent carburant, et son oxydation a un double intérêt : récupérer de l'énergie dont la nitrogénase est particulièrement avide, éponger le cas échéant les molécules d'oxygène qui traînent dans le secteur et risqueraient d'inactiver la nitrogénase. Les bactéries qui acceptent d'assimiler l'azote malgré une certaine aérobiose ont toujours des oxydations extrêmement puissantes qui deviennent une véritable détoxification d'O_2, une méthode sûrement efficace puisque les *Azotobacter* peuvent encore fixer l'azote sous une pression d'oxygène atmosphérique quasi normale.

Dans le modèle réactionnel accepté provisoirement, l'apparition de l'hydrogène, après que la protéine ait reçu au moins 3 électrons et probablement 4, précèderait l'entrée de N_2 sur le site. Le substrat serait donc reçu par une protéine partiellement réduite. Le schéma est une interprétation simplifiée où on voit que le noyau Fe-Mo serait réduit sur le molybdène puis sur le fer avant toute fixation et attaque de N_2.



Principe de la nitrogénase

Le fer réduit forme un hydrure, et l'azote se fixerait sur le complexe en chassant une molécule d'hydrogène.

Pour attaquer l'azote et lui faire franchir la première étape, qui est comme on le sait la plus difficile, la nitrogénase devrait subir ainsi une sorte d'activation préliminaire lui permettant de traiter les substrats coriaces comme N_2, et qui ne serait pas nécessaire pour d'autres substrats comme l'acétylène, dont la réduction à 2 électrons en éthylène ne produit pas d'hydrogène. Deux électrons suffisent également pour transformer l'oxyde nitreux : $N_2O + 2\ H^+ + 2\ e^- \longrightarrow N_2 + H_2O$. Les protons sont oxydés dans cette réaction mais ne produisent pas non plus d'hydrogène. Dans le cas de l'ion cyanure, la réaction observée est :

$$CN^- + 7\ H^+ + 6\ e^- \longrightarrow CH_4 + NH_3.$$

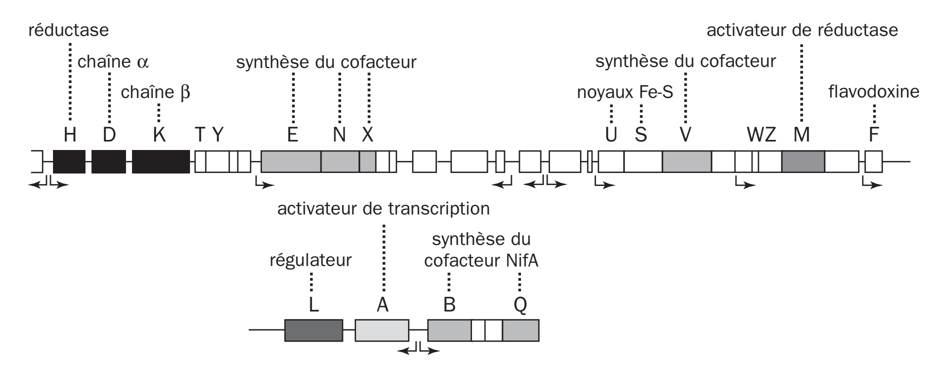
Le cyanure et HCN se lient à l'enzyme à un stade plus précoce que N_2, et ne provoquent pas de libération d'hydrogène. De façon générale la nitrogénase admet comme substrats une gamme variée de composés à faible masse moléculaire caractérisés par une liaison C–C, C–N, N–N, N–O ou C–S double ou triple **[16]**. Seule dans cette série de réactions, la réduction de l'azote apparaît comme une situation extrême qui se traduit par l'émission supplémentaire de H_2.

La fixation de l'azote est beaucoup plus répandue dans l'environnement que supposé initialement. On peut s'en rendre compte à l'aide de sondes nucléiques reproduisant un consensus au niveau de la séquence de la nitrogénase réductase (NifH), car celle-ci présente de grandes homologies d'une espèce à l'autre. Les expériences d'hybridation moléculaire ont permis de détecter la présence de la nitrogénase dans un grand nombre de bactéries du sol, avec des variantes dans le fonctionnement qui ne seront pas abordées ici. On se demande même si de nombreuses espèces bactériennes impliquées dans des biodégradations, en particulier celles qui vivent de préférence en anaérobiose, ne sont pas en même temps

assimilatrices d'azote. Cette propriété a pu passer bien souvent inaperçue, car elle ne se manifeste que dans des conditions définies, en particulier lorsqu'il n'existe aucune autre ressource azotée.

5.4 - CONTRÔLE DE L'ASSIMILATION DE L'AZOTE

Pour élaborer une enzyme aussi perfectionnée que la nitrogénase, les bactéries ont besoin d'un nombre important de fonctions pour la synthèse et l'insertion des cofacteurs. Aussi l'assimilation du diazote est-elle déterminée par un grand nombre de gènes, une vingtaine au moins, qui sont les **gènes *nif*** pour l'enzyme à molybdène. La génétique du système *nif* a des côtés spectaculaires. Chez *Klebsiella pneumoniae*, tous les gènes dont dépend l'assimilation de l'azote sont adjacents sur un même segment d'ADN d'une longueur de 23 kb. Ces gènes sont répartis en 7 opérons au moins. Il existe des variantes. Chez *Azotobacter*, les gènes *nif* sont répartis en deux ensembles. Des séries séparées codent pour les nitrogénases à vanadium et à fer, respectivement les gènes *vnf* et *anf*. Nous ne retiendrons que l'appareil *nif*. Un diagramme permet de se faire une idée sur la complexité de la machinerie mise en jeu, codée par 29 kb d'ADN **[17]**. La nitrogénase proprement dite est codée par ***nifHDK***, tandis que les autres gènes concernent la fabrication du cofacteur à Mo et des noyaux fer-soufre. Les gènes *nif* d'*Acetobacter diazotrophicus* forment une seule unité, peut-être la plus grande connue, d'une longueur de 30,5 kb **[18]**. Cette organisation génétique ne reste pas identique chez tous les cas de figure et peut présenter des différences dans la disposition des gènes. Les homologies restent néanmoins fortes d'une espèce à l'autre et on en tire l'impression que l'arsenal génétique observé ici ou là trahit une origine évolutive commune.



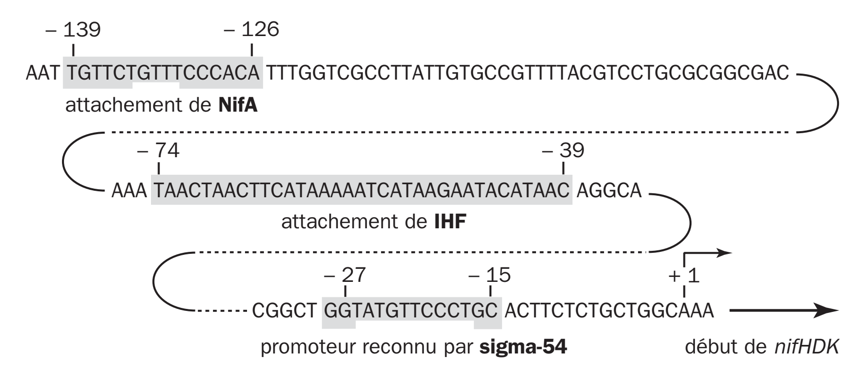
Gènes nif d'Azotobacter vinelandii

L'opéron *nifHDK* est repéré en noir, les gènes dirigent des fonctions de service. Par exemple *nifT* et *nifY* sont transcrits en aval dans la même unité. Le premier ne semble pas essentiel à la fixation de l'azote et sa fonction n'est pas connue. Le second code pour une protéine qui aide à la maturation de la nitrogénase **[19]**. Elle se lie à l'enzyme en cours d'assemblage et s'en détache quand sa structure définitive est acquise. Plusieurs gènes sont impliqués dans la réalisation du cofacteur à

molybdène. Les protéines NifU et NifS interviennent dans la synthèse des noyaux fer-soufre. NifS, une soufre transférase[3], étant chargée de récupérer le soufre dans la cystéine pour le mettre à la disposition des différents noyaux fer-soufre **[20]**. La protéine NifV interviendrait dans la synthèse de l'homocitrate. et NifWZ formerait un complexe exerçant un effet protecteur sur la nitrogénase contre l'oxygène **[21]**.

Nous savons que la nitrogénase est un outil coûteux en énergie pour la cellule bactérienne. Elle est donc soumise à un contrôle très strict à deux niveaux, la transcription par induction et répression, et l'activité enzymatique. Trois paramètres sont déterminants : l'absence d'O_2, la disponibilité de ressources énergétiques, un taux faible d'azote ammoniacal. Ce problème a des aspects intéressants qui méritent quelques explications.

Chez les protéobactéries l'expression des gènes *nif* est en général sous la dépendance d'un activateur spécialisé, **NifA**, qui favorise l'amorçage d'une transcription au niveau d'un type particulier de promoteur, reconnu par *sigma-54**. En s'installant sur l'ADN, NifA vient en contact avec l'ARN-polymérase à la faveur d'une boucle de la double hélice et autorise l'amorçage en hydrolysant de l'ATP **[22]**. Chez les γ-protéobactéries assimilatrices de N_2 comme *Azotobacter vinelandii* et *Klebsiella pneumoniae*, une seconde protéine, **NifL**, inhibe l'activité de NifA en s'associant avec elle sans se lier directement à l'ADN **[23]**. Une boucle dans l'ADN est donc nécessaire pour que NifA puisse se rapprocher du site d'amorçage parce son lieu de fixation est assez éloigné en amont comme l'indique le schéma de la séquence. La courbure est favorisée par une protéine supplémentaire, IHF, qui participe en quelque sorte au mécanisme régulateur. C'est un problème que nous avons déjà rencontré dans le chapitre précédent. Il est assez caractéristique des régulations chez les procaryotes.

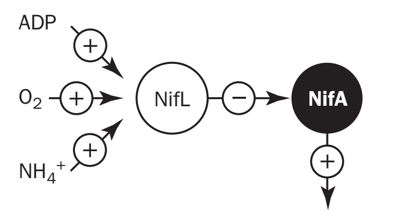


Séquences reconnues par Nifa, IHF, sigma-54 (Klebsiella pneumoniae)

Les deux gènes des protéines partenaires NifA et NifL sont sur un même opéron, comme on peut le voir sur la carte des gènes donnée précédemment. Chez *Azotobacter*, l'opéron *nifAL* est exprimé en permanence (synthèse constitutive).

---

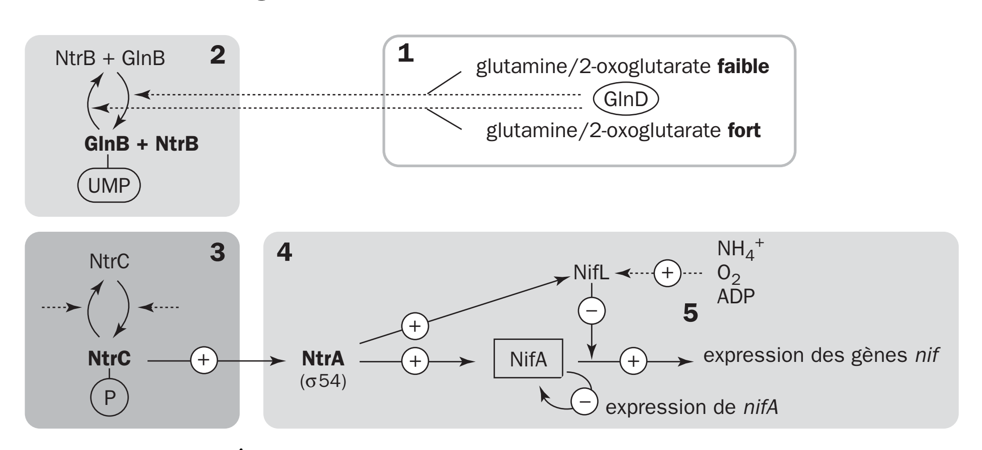
3 - Une cystéine désulfurase, enzyme à pyridoxal phosphate.



La situation est un peu plus simple que chez *Klebsiella* où la synthèse de NifA et NifL est elle-même régulée par NtrC et GlnK.

Azotobacter

NifL canalise les régulations, l'inhibition qu'elle exerce sur NifA est stimulée par un niveau énergétique cellulaire bas (ADP > ATP), la présence d'oxygène (redox élévé) ou par un excès d'azote ammoniacal. NifL intègre ces différents signaux et sa structure est faite de domaines articulés qui lui permet d'étouffer l'action de NifA ou de s'en libérer en fonction des signaux reçus. Une véritable vanne de réglage.
L'assimilation de N_2 par la nitrogénase n'est qu'une opération particulière du métabolisme azoté en général, dont les régulations détaillées ont été analysées en premier lieu chez *Escherichia coli* selon un mécanisme assez représentatif. On sait que la glutamine est l'une des principales portes d'entrée de l'azote ammoniacal dans les molécules organiques.



Régulation partielle chez Klebsiella pneumoniae

Lorsque la glutamine est à taux faible, une triple cascade régulatrice conduit :

- à activer la synthèse de la **glutamine** par la glutamine synthétase ;
- à rendre fonctionnel un activateur de transcription, ***NtrC****, en NtrC-P ;
- à transformer par uridylation un autre facteur régulateur, **GlnK**, transformé en GlnK-UMP, que nous retrouverons plus loin.

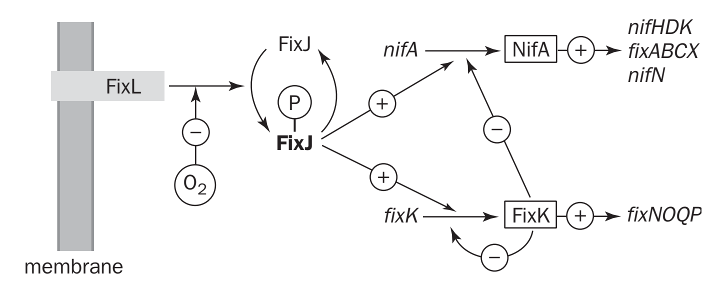
Ces trois volets existent chez les assimilateurs d'azote. Les circuits de réglage sont indiqués sur un tableau partiel de la cascade régulatrice chez *Klebsiella pneumoniae*, une espèce micro-aérophile qui peut vivre avec ou sans dioxygène. Quatre **niveaux** d'action ont été numérotés sur le plan.Le **niveau 1** concerne l'abondance de l'azote déjà fixé sous forme organique, représentée par la glutamine. Elle est détectée par **GlnD**, qui est une enzyme fonctionnant comme uridylase ou désuridylase (fixe ou enlève le nucléotide UMP). La cible est **GlnB**, ainsi qu'une deuxième protéine qui n'est pas représentée dans un but de simplification , soit GlnK.

Le **niveau 2** est l'uridylation de GlnB en GlnB-UMP qui modifie l'activité de NtrB. Celle-ci est une protéine kinase (avec ATP) ou au contraire une protéine phosphatase (une enzyme PÉNÉLOPE qui fait et défait) selon l'état de GlnB. Au **niveau 3**, la protéine NtrC est phosphorylée par NtrB, déphosphorylée par NtrB-UMP. En fonction de son état à l'étape **2**, NtrB phosphoryle NtrC ou la déphosphoryle. **NtrC-P** est un activateur de transcription qui va commander une cascade de transcriptions commençant par l'induction au **niveau 4** de NtrA, appelé aussi facteur sigma-54. Au **niveau 5**, NifA est l'activateur de transcription des gènes *nif* et autorégule sa propre synthèse. NifL est un régulateur contrôlé par l'ammonium, l'oxygène, et l'état énergétique de la cellule. Quand celui-ci est bas, NifL freine l'activité de NifA et retarde l'expression des gènes *nif* (le fonctionnement de la nitrogénase ne ferait qu'aggraver le déficit énergétique).

Résumons cette cascade. Un taux faible d'azote organique (glutamine/2-oxoglutarate faible) active la formation de GlnB-UMP, qui phosphoryle NtrC. Celle-ci active la synthèse de NtrA, qui commande la sortie du couple régulateur NifL/NifA. Cette dernière protéine active l'expression des gènes *nif*. Il y a donc intégration de plusieurs paramètres, le taux d'azote organique, l'azote minéral (l'ammonium), l'oxygène et l'état énergétique de la cellule qui devient défavorable quand le rapport ADP/ATP s'élève. Grâce à ce dispositif, la cellule peut assimiler le diazote seulement si elle en a besoin, pourvu qu'elle dispose d'assez d'énergie et que l'oxygène ne réduise pas ses efforts à néant. On voit que cette cascade est réversible par ses effets et peut être "allumée" ou, "éteinte" en fonction des conditions. La présence des deux facteurs, la kinase NtrB et l'activateur de transcription NtrC, est une situation emblématique dont la physiologie des procaryotes est friande (voir *régulations à deux composants**). En outre il y a un effet amplificateur, car un signal faible au départ suffit à entraîner une variation brutale de l'expression des gènes *nif* à la sortie grâce au robinet essentiel qui est NifA. Les deux protéines NifA et NifL sont synthétisées en quantités égales grâce à la structure de l'opéron qui associe les deux gènes **[24]**. Le subtil équilibre entre ces deux protéines représente la véritable clé qui ouvre ou ferme les gènes *nif* chez les bactéries qui assimilent l'azote à l'état libre comme *Azotobacter* et *Klebsiella*. La paire NifA/NifL est un système d'asservissement qui permet de régler l'expression des gènes *nif* dans une certain fourchette en fonction des besoins azotés **[25]**.

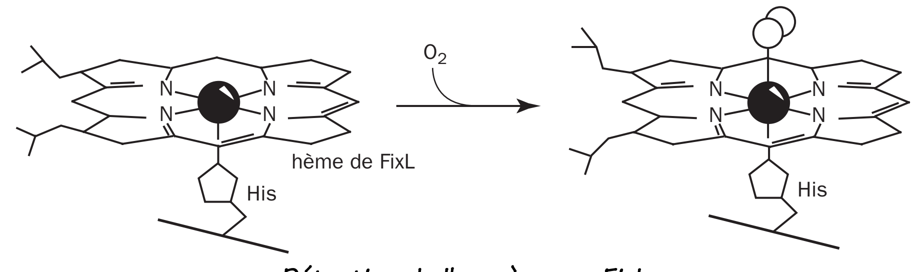
Comment la protéine **NifL** intervient-elle ? C'est à son niveau que se fait le réglage général en fonction de la présence d'O_2, de l'ADP et de l'ammonium. NifL est une flavoprotéine portant du FAD dont l'état d'oxydoréduction est commandé par le niveau d'oxygène. Le cofacteur FAD se comporte de la même façon que dans une oxydase, mais la protéine est dépourvue d'activité enzymatique. Elle ne réagit que par ses changements de conformation. Cette protéine serait chargée de limiter les ardeurs de NifA, mais une petite simplification a été faite au tableau. NifL est sous le contrôle à la fois de NtrA et de GlnK. Celle-ci est soumise à uridylation en fonction de l'abondance d'azote fixé (la glutamine), tout comme l'était GlnB ci-dessus. GlnK a pour mission d'exercer un réglage fin supplémentaire sur NifL. Quand l'azote de la glutamine est vraiment limitant, GlnK diminue l'effet inhibiteur de NifL sur NifA, ce qui est physiologiquement logique puisque l'action activatrice de NifA sur la transcription des gènes *nif* sera renforcée.

Le principe des réglages présentés ici connaît des variations dans le détail en fonction des espèces libres. Chez les phototrophes comme *Rhodobacter capsulatus*, un contrôle supplémentaire est exercé par la photosynthèse qui génère l'énergie nécessaire à la nitrogénase. Les deux facteurs essentiels sont alors l'anaérobiose et la lumière. Les espèces symbiotiques comme *Rhizobium* ont des solutions différentes de celles de *Klebsiella* et adaptées aux conditions. Le principal facteur qui allume les gènes *nif* est alors la raréfaction de l'oxygène. L'entrée en symbiose s'accompagne d'un arrêt de croissance, d'une différenciation dans un environnement microaérobie et riche en molécules azotées comme la glutamine qui est fournie par la plante. L'outil essentiel chez *R. meliloti* est un système classique à deux composants du type NtB/NtrC, appelé ici **FixL/FixJ**. La protéine FixL est le capteur qui estime le taux d'oxygène, FixJ est un activateur de transcription favorisant l'apparition des nouveaux activateurs, NifA et FixK. La protéine FixN représente une ferrédoxine **[26]**.



Régulation commandée par FixL chez Rhizobium

Le capteur FixL est une protéine kinase membranaire héminique contenant du fer(II). En l'absence de O_2 ou lorsque sa teneur descend au-dessous de 10 μM, elle commence par s'autophosphoryler, puis injecte son phosphate sur sa partenaire FixJ. En se liant à l'ADN, celle-ci active la transcription des gènes *nifA* et *fixK*. Les protéines correspondantes sont elles-mêmes des activateurs pour les gènes *nif* et *fix*. FixK auto-limite sa propre production et celle de NifA. L'oxygène inhibe toute la cascade en se fixant sur le fer du capteur. La structure de FixL est connue **[27]**. Son fonctionnement rappelle celui de l'hémoglobine : la géométrie du fer(II) est octaédrique, mais incomplète. Quatre liaisons de coordinence sont au sein de la porphyrine, une cinquième est dans une direction orthogonale et se fait sur histidine. La sixième est libre et c'est là que s'installe l'oxygène. L'occupation de la sixième coordinence par O_2 déclenche un petit changement de conformation qui se répercute sur l'activité du domaine voisin comme kinase.



Détection de l'oxygène par FixL

La cascade commandée par FixL pourrait ne pas s'arrêter rapidement dans le cas d'un apport d'oxygène. L'activation des gènes placés en aval se poursuivrait intempestivement par la présence de FixJ phosphorylée. Or celle-ci n'est pas stable et perd continuellement son phosphate à défaut d'être rechargée. Ce mécanisme permet l'arrêt rapide de la cascade jusqu'à une nouvelle phosphorylation déclenchée par la disparition d'O_2. L'activation tend à cesser par déphosphorylation sponanée de FixJ. La recharge en phosphate se fait continuellement en conditions de faible taux d'O_2 et on s'explique aisément que l'effet activateur soit réversible. L'ajustement se fait par l'instabilité de la liaison du phosphate. Elle se défait et se refait sans cesse. Une légère variation du taux de phosphorylation commandée par O_2 suffit à contrôler l'effet activateur.

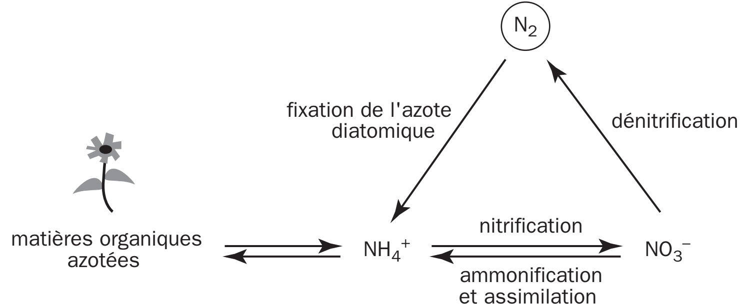
Le modèle de base présenté ici connaît des variations avec les espèces, souvent avec des contrôles très compliqués adaptés à la physiologie des cellules. *Azorhizobium caulinodans* peut assimiler l'azote aussi bien en croissance libre qu'en symbiose sur légumineuses du genre *Sesbania*. Son assimilation de N_2 est contrôlée à la fois par le système Ntr et par FixJ. Le travail de la nitrogénase consomme toujours beaucoup d'énergie alors que les bactéries doivent faire face à un taux d'oxygène très faible. Elles ont donc besoin de protéines respiratoires adaptées codées par les gènes *fix*, en particulier une nouvelle oxydase terminale liée à la membrane, de type cbb_3, codée par *fixOQP*.

Toutes ces régulations complexes sont liées au fait que la nitrogénase est décidément une enzyme coûteuse pour la cellule, non seulement par le nombre de facteurs et de protéines mis en jeu, mais par son fonctionnement assoiffé d'énergie. Les mécanismes d'induction et répression des gènes sont efficaces mais lents. Dans la compétition vitale le facteur vitesse compte. Une nitrogénase qui continuerait à tourner quelques temps en conditions défavorables consommerait inutilement de l'ATP. Il existe effectivement une régulation rapide et réversible, qui consiste à inhiber précipitamment l'activité de l'enzyme dans les conditions où elle n'est pas nécessaire. Cette régulation est basée sur une **ADP-ribosylation**, catalysée par une ADP-ribosyltransférase. Avec NAD^+ comme donneur. L'opération inverse est faite par une glycohydrolase. Ces deux enzymes antagonistes, codées par *draT* et *draG*, exercent leur action sur la partie réductase de la nitrogénase comme un interrupteur "ON/OFF". Ce mode de contrôle est présent surtout chez les phototrophes, absent chez d'autres espèces comme *Klebsiella*. En présence d'ions ammonium ou d'autres effecteurs, l' ADP-ribosylation inactive la réductase. Quand les conditions redeviennent favorables, le blocage est supprimé par une enzyme d'activation qui élimine l'élément ADP-ribose. Or cette "activase" est très sensible à O_2 et l'opération échoue en cas d'aérobiose, ce qui tombe bien puisqu'il ne convient pas de réactiver la nitrogénase ! Cependant aucune solution n'est parfaite. Diverses espèces gênées par l'aérobiose modulent leur assimilation de l'azote par plusieurs réseaux de contrôle, plusieurs nitrogénases. Ainsi le phototrophe *Rhodobacter capsulatus* a deux nitrogénases, une à Mo, l'autre sans Mo ni métal autre que le fer. L'activité de ces deux enzymes est contrôlée par un double circuit qui autorise certainement une meilleure optimisation dans toutes les conditions.

L'assimilation de l'azote repose donc sur une artillerie lourde faisant appel à de nombreux cofacteurs, protéines et mécanismes régulateurs. Cette phase essentielle du cycle de l'azote n'a pas de prix, car la recharge de la biosphère en azote organique, et par contrecoup toute l'activité de recyclage de la biosphère, en dépendent.

5.5 - LES VOIES DU NITRATE

La biosphère dispose de trois principaux réservoirs d'azote minéral sous forme de diazote, d'ammonium et de nitrate. L'activité des organismes bactériens fait communiquer ces réservoirs, comme l'indique un schéma simplifié. On constate immédiatement que certaines étapes sont notées comme irréversibles. Il s'agit de la réduction de N_2 en ammonium et de celle du nitrate en N_2 par le mécanisme appelé **dénitrification**. Le cycle indiqué ne peut donc tourner que dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.



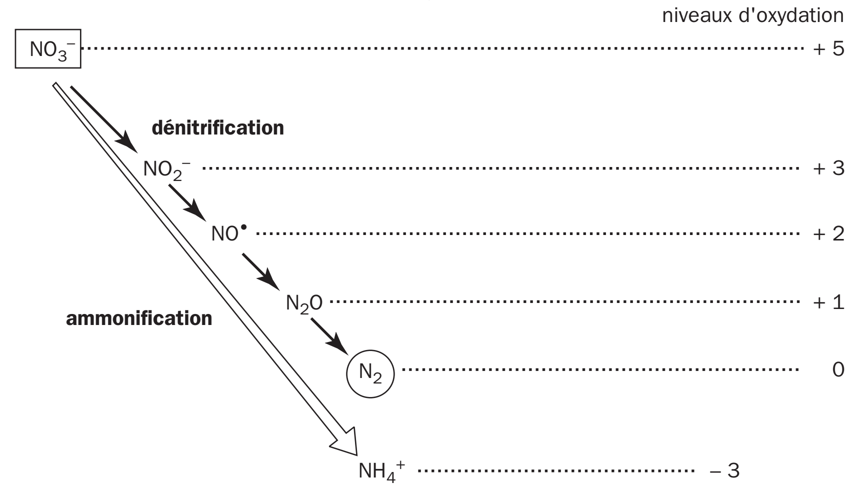
Grandes conversions de l'azote par les procaryotes

Les différents échanges prêtent parfois à des confusions de terminologie. La réduction de N_2 en ammonium engendre l'azote ammoniacal directement utilisable par le métabolisme cellulaire. C'est donc une assimilation. Le produit de l'opération est l'azote ammoniacal et alimente les synthèses de l'organisme. L'assimilation azotée s'effectue aussi massivement dans la nature après décomposition des matières organiques et production d'azote ammoniacal. Il existe aussi une réduction de l'ion nitrate qui fournit de l'ammonium assimilable mais produit de l'énergie et s'appelle **ammonification**. La démarcation entre assimilation et dissimilation est parfois incertaine, voire arbitraire, mais le terme de dénitrification est généralement utilisé pour la réduction du nitrate dont le terme ultime est N_2, non récupéré par la machinerie cellulaire et seulement éliminé. Sur le plan pratique, de nombreuses espèces bactériennes du sol peuvent être cultivées sur nitrate qui est assimilé comme seule source azotée. Pour résumer ces questions sémantiques nous adopterons les conventions proposées par MORENO-VIVIAN et FERGUSON **[28]**.

La respiration est une chaîne d'oxydoréductions non assimilatrices couplées à la formation d'un potentiel membranaire, autrement dit qui est productrice d'énergie, c'est-à-dire électrogénique. La dénitrification sensu stricto est dans ce cas.

Elle fonctionne en général lorsque l'oxygène est peu abondant ou absent (sauf dans certains cas **[29]**) et les enzymes concernées sont généralement induites par l'anaérobiose. La présence d'ammonium dans le milieu est en principe sans action **[30]**. La dissimilation offre un cadre différent. Elle fait passer ici le nitrate et le nitrite à NH_3, avec ou sans récupération d'énergie. L'ammonification entre dans ce cas de figure. En fait il existe un certain recouvrement entre respiration proprement dite et dissimilation, ne serait-ce que lors de la conversion du nitrate en nitrite. La dissimilation est caractérisée par l'existence d'une nitrite réductase spéciale (distincte de celle qui fonctionne dans la dénitrification), car elle catalyse la réduction directe à 6 électrons du nitrite en ammoniac. L'assimilation est entièrement tendue vers la production d'azote ammoniacal assimilable par le métabolisme. Elle met en jeu des enzymes induites par le nitrate et réprimées par l'ammonium **[31]**.

Revenons à la dénitrification. Elle emploie le nitrate comme oxydant au même titre que l'oxygène quand celui-ci fait défaut et produit des oxydes d'azote comme intermédiaires qui sont eux-mêmes accepteurs d'électrons respiratoires : l'ion nitrite (NO_2^-), l'oxyde nitrique (NO) et l'oxyde nitreux (N_2O). Les substrats initiaux sont de même nature que ceux qui sont oxydés par respiration aérobie et les transporteurs d'oxydoréduction, quoique distincts, sont de même nature. Certaines espèces n'ont pas toutes les étapes de la dénitrification et ne sont pas considérées comme de véritables dénitrifiants. *Escherichia coli* est dans ce cas mais peut cependant transformer le nitrate en nitrite et en tirer de l'énergie. Lorsque le stade ultime (N_2) n'est pas atteint, il en résulte en quelque sorte une dénitrification avortée, qui peut s'arrêter au stade nitrite, ou encore à l'oxyde nitreux. Celui-ci est évacué dans l'atmosphère où il apporte sa contribution au fameux effet de serre. Diverses espèces vont jusqu'à recycler le diazote qu'elles engendrent par dénitrification à l'aide de leur nitrogénase **[32]**. Il faut en déduire que la dénitrification est une source d'énergie assez performante pour engendrer tout l'ATP dont la nitrogénase a besoin. La dénitrification est également commune chez les *Rhizobium* et autres bactéries assimilatrices d'azote qu'on trouve en symbiose avec des plantes. Le tableau résume les différents niveaux d'oxydation de l'azote.



La dénitrification s'observe surtout parmi les protéobactéries, les archaebactéries halophiles et hyperthermophiles. La plupart des organismes dénitrifiants sont des hétérotrophes qui couplent la réduction des oxydes d'azote à l'oxydation d'une source organique, mais la dénitrification peut aussi s'exercer sur l'oxydation de divers composés soufrés, de l'hydrogène ou du Fe(II) **[33]**. La dénitrification est donc un phénomène extrêmement répandu et varié dans l'environnement. Elle alimente en énergie maintes biodégradations, mais peut rester incomplète en n'allant pas jusqu'à N_2. Une véritable dénitrification va au-delà du stade nitrite, et produit au moins NO ou N_2O. En s'arrêtant au nitrite, les entérobactéries avec *Escherichia coli* en tête ne font que le début du chemin. La dénitrification est au contraire complète dans le genre *Pseudomonas*. De nombreuses études ont été réalisées avec *P. stutzeri* **[34]**, dont l'habitat naturel est le sol, la boue, les eaux stagnantes et les déjections animales.

Comme les différentes étapes de la dénitrification opèrent à des potentiels d'oxydoréduction moins élevés que celui de la réduction de O_2 en molécules d'eau, la dénitrification est toujours un peu moins efficace sur le plan énergétique qu'une oxydation respiratoire sur l'oxygène. Pour la réduction du nitrate en nitrite, le potentiel standard $E'°(NO_3^-/NO_2^-)$ est de + 430 mV. Du nitrite à l'oxyde nitreux, le potentiel $E'°(NO_2^-/NO)$ est de + 350 mV. Ces valeurs se comparent au potentiel de l'oxygène (+ 810 mV). Les bactéries vivant en aérobiose n'ont donc pas intérêt à utiliser du nitrate pour leurs oxydations, alors qu'elles tenteront de la faire en anaérobiose. On s'explique ainsi pourquoi la dénitrification est délaissée en présence d'oxygène sauf quand il est à taux très faible, soit 1-5 µM au lieu de 220-240 µM à saturation avec l'air ambiant, conditions dites micro-aérobies. Cependant la respiration sur nitrate peut supporter une certaine aérobiose, et de nombreuses espèces bactériennes du sol sont capables de mener de front la respiration aérobie classique et la dénitrification **[35]**. Ce n'est donc pas un choix de tout ou rien. Mais comme la respiration sur oxygène reste la solution la plus rentable, une régulation au niveau génétique entrave plus ou moins la synthèse des outils de la dénitrification en aérobiose, et induit au contraire leur synthèse après disparition d'O_2. La transition supportée par les organismes dits aérobies facultatifs s'accompagne par un profond bouleversement de l'expression des gènes et de la carte métabolique. Le phénomène a été étudié très précisément sur diverses souches de laboratoire, dont *Escherichia coli* où la situation, revue par COLE **[36]**, apparaît comme complexe. La présence de nitrate permet donc à une multitude d'espèces microbiennes de se développer dans les eaux ou les couches du sol où l'oxygène se fait rare, et autorise dans certains cas des recyclages efficaces par des voies distinctes de l'aérobiose. Cela tombe bien : les nitrates souvent ajoutés en excès aux cultures comme fertilisants encouragent en même temps le nettoyage du sol !

Tournons-nous vers l'**ammonification**, qui est un passage du nitrate et du nitrite à l'ammoniac avec production d'énergie dans le passage du nitrate au nitrite. Cette opération répond à plusieurs objectifs. Le principal est la production de NH_3 ou d'ions ammonium qui seront récupérés par la cellule pour ses synthèses, et correspond à une assimilation. Mais l'ammonification produit de l'ammonium en excès sur les besoins réels de la cellule et correspond aussi à une détoxification. Elle contribue à éliminer les nitrites, composés très toxiques, et permet de compenser

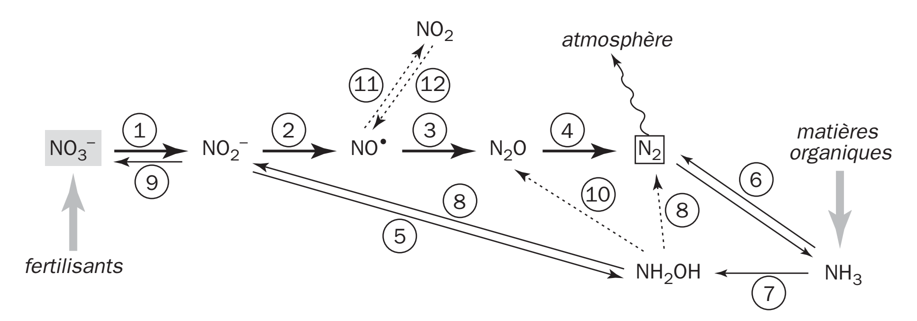
l'excès de pouvoir réducteur dans certaines circonstances physiologiques, empêchant ainsi le potentiel redox d'atteindre des valeurs trop basses qui sont mal supportées par beaucoup de micro-organismes. Les différents modes de réduction des nitrates et nitrites fonctionnent parfois simultanément, avec les mêmes outils. On tendait autrefois à opposer dissimilation et assimilation. La dissimilation désignait tout ce qui ne produisait pas quelque chose que la cellule ne récupérait pas comme substrat pour ses synthèses. La dénitrification était donc considérée comme une dissimilation. Une bactérie très commune que l'on croyait autrefois strictement aérobie, *Bacillus subtilis*, peut faire en anaérobiose une respiration qui va du nitrate au nitrite (donc productrice d'énergie), puis passe directement à l'ammoniac par une nitrite réductase dissimilatrice facilement inactivée par l'oxygène **[37]**. En fonction des différents impératifs de croissance, les bactéries disposent de plusieurs boîtes à outils, et c'est sans doute pour cela que dans une même espèce on voit assez souvent des nitrate et nitrite réductases différentes présentes en double ou en triple. Des enzymes variées répondent à toutes les situations. Ces réductases seront examinées au Chapitre 6.

La dénitrification contribue aux échanges considérables entre les sols, les eaux et l'atmosphère terrestre. Rappelons que l'oxyde nitreux ou N_2O (appelé encore oxyde de diazote) est un gaz à effet de serre. Malgré sa faible concentration de (0,3 ppmv), il représente près d'un cinquième de l'effet produit par le dioxyde de carbone car son pouvoir réfléchissant est 230 fois plus élevé à masse égale. Sa teneur est en lente augmentation (0,2 à 0,3% par an), peut-être par suite de l'usage accru des fertilisants azotés. Il a déjà été signalé que le gaz N_2O est accusé d'accentuer les dommages faits à la couche d'ozone par des contaminants halogénés comme les fluorocarbones du type Fréon. En somme la dénitrification suscite trois grands courants d'intérêt. Le premier est tout simplement la consommation en pure perte du nitrate ajouté à grand frais comme engrais par les fermiers, car il est à la fois consommé par les micro-organismes et entraîné par l'eau avec la pollution des rivières que l'on sait. Le second thème de préoccupation est la montée de l'effet de serre, favorisé par la dénitrification et encouragé par la culture intensive. Le troisième sujet d'intérêt concerne l'action bénéfique de la dénitrification comme moteur de la destruction de certains polluants organiques en absence d'oxygène.

La dénitrification est difficile à mesurer avec précision parce que tous les composés minéraux azotés sont facilement diffusibles comme gaz ou solubilisés par l'eau. NO et N_2O sont des étapes obligatoires de la dénitrification, mais apparaissent de façon fugitive car ils sont éliminés rapidement. Le premier est un radical qui s'oxyde spontanément en NO_2 par l'oxygène selon une réaction trimoléculaire : $2\ NO^{\bullet} + O_2 \longrightarrow 2\ NO_2$. Il en résulte que sur le plan cinétique la vitesse de cette oxydation dépend du carré de la concentration de NO. La réaction est cependant lente dans les conditions de la dénitrification, où NO ne s'accumule pas (il serait d'ailleurs toxique). La demi-vie de NO dans l'air ne descend au-dessous d'une heure que si sa concentration en ordre de grandeur dépasse 100 ppmv. La dénitrification, favorisée en principe par l'anaérobiose, tolère la présence d'O_2 à taux significatif chez diverses espèces. Or la présence de l'oxygène favorise l'oxydation en retour de l'ammoniac, de NO et NO_2, avec comme stade ultime la

formation de nitrate, travail réalisé par les bactéries nitrifiantes. Lorsque ces oxydations surviennent en même temps que la dénitrification, elles compliquent forcément les mesures. Voici un exemple. *Nitrosomonas eutropha* est une espèce nitrifiante : elle oxyde l'ammoniac avec O_2, opération productrice d'énergie. Ce litho-autotrophe obligatoire est capable de produire N_2O et même N_2 à partir de nitrite. On a pu le démontrer à l'aide d'expériences de marquage par l'azote-15 **[38]**. Pourtant lorsqu'elle est placée en anaérobiose, son métabolisme se branche sur la dénitrification. Il se produit alors une chose intéressante. En atmosphère contenant le dioxyde d'azote (NO_2), elle oxyde l'ammoniac en passant par l'hydroxylamine (NH_2OH), NO et le nitrite, et récupère ces deux derniers comme accepteurs pour produire... N_2O et N_2. Il y a donc bien nitrification et dénitrification simultanées **[39]**. Cette espèce est autotrophe, et se développe efficacement en présence de NH_3, de NO_2 et de CO_2, ce qui est une façon de visiter tous les râteliers. Cette situation est sans doute assez répandue dans l'environnement. Dans le cas de *Pseudomonas putida*, un hétérotrophe, l'oxydation de NH_3 en hydroxylamine, nitrite et nitrate, est possible en anaérobiose. Puis le nitrite et le nitrate sont utilisés à leur tour comme accepteurs, et il se forme un peu de NO **[40]**. Un autre *Pseudomonas,* cultivé sur acétate en présence d'O_2, oxyde l'hydroxylamine comme source d'énergie additionnelle. Il apparaît du nitrite, ainsi que N_2O qui est la marque d'une dénitrification aérobie **[41]**. Cette faculté des bactéries de jouer sur tous les tableaux fait que l'apparition des oxydes d'azote, NO et N_2O, n'est plus la marque d'une activité anaérobie, comme on avait pu le croire antérieurement. L'apparition de ces gaz en aérobiose est liée en grande partie à la nitrification par des germes comme *Nitrosomonas*, alors qu'en anaérobiose les responsables sont plutôt les dénitrifiants orthodoxes comme *Pseudomonas* et *Alcaligenes* **[42]**. L'extrapolation sur le terrain des observations de laboratoire semble valable. Des auteurs belges **[43]** ont montré que des boues d'épuration limitées en oxygène, dans les conditions dites *OLAND**, oxydent l'ammoniac à la fois en nitrite, nitrate et N_2. Ce dernier emporte 40% de l'azote initial. Il est supposé que les boues effectuent une nitrification qui est couplée à une dénitrification partielle : le nitrite et le NO formés conduiraient à N_2 en servant d'accepteurs d'électrons. En conclusion, il existe un recouvrement assez large entre la dénitrification et les oxydations inverses dans une gamme étendue de situations. Ces relations sont représentées par un schéma avec désignation des enzymes responsables **[44]**.

Le cycle indiqué par le tableau ci-contre met à contribution plusieurs sortes d'organismes, avec des transferts de matières d'un biotope à un autre dans les sols et les eaux, et offrant toutes les combinaisons possibles. La nitrogénase (réaction **6**) est un maillon important de ce cycle approvisionné par trois grandes sources, qui sont l'atmosphère (réaction **6**), les décompositions de matières organiques génératrices d'ammoniac, et les nitrates apportés par les engrais agricoles et l'oxydation de l'ammoniac. La réaction **8** appartient à l'hydroxylamine oxydoréductase. Elle fait fonction de NH_2OH déshydrogénase et produit à la fois du nitrite et du diazote (N_2). Le passage de l'hydroxylamine au nitrite élimine à lui seul 4 électrons. Où vont-ils ? La nitrification est nécessairement aérobie.



1 - Nitrate réductase
2 - Nitrite réductase
3 - Oxyde nitrique réductase
4 - Oxyde nitreux réductase
5 - Ferrédoxine-nitrite réductase [4]
6 - Assimilation de N_2 (nitrogénase)
7 - Ammoniac mono-oxygénase (AMO)
8 - Hydroxylamine oxydoréductase
9 - Nitrite oxydase
10 - (incomplètement caractérisée)
11 - Oxydation spontanée de NO par O_2
12 - (incomplètement caractérisée)

Interconversions azotées

Sur les 4 électrons, deux iront à l'oxy-gène par une oxydase terminale selon :

$$NH_2OH + O_2 \longrightarrow NO_2^- + H^+ + H_2O$$

Où vont les deux autres électrons ? Ils sont récupérés par l'oxydation de l'ammoniac en hydroxylamine (réaction **7**) catalysée par l'ammoniac mono-oxygénase, qui a besoin à la fois d'O_2 et d'une source réductrice auxiliaire. L'oxydation de l'hydroxylamine produira de l'énergie et fournira en même temps ces éléments réducteurs dont l'oxygénation de NH_3 a besoin, selon :

$$NH_3 + O_2 + 2e^- + 2\,H^+ \longrightarrow NH_2OH + H_2O$$

Les bactéries peuvent se développer en aérobiose sur hydroxylamine **[45]**. L'étude a montré que l'étape énergétique de la nitrification par *Nitrosomonas europaea* est bien l'oxydation de l'hydroxylamine en nitrite et non pas la réaction de l'oxygénase. Si un déficit en O_2 survient, les bactéries se tournent vers un métabolisme de dénitrification où le nitrite prend la place d'O_2 comme accepteur d'électrons.

Dans ce chassé-croisé de réactions, l'analyse expérimentale a souvent recours à des inhibiteurs spécifiques pour bloquer telle ou telle étape. C'est le cas de l'acétylène. Il bloque à la fois l'étape **4** de la dénitrification catalysée par N_2O réductase, et la réaction **7** de l'ammoniac mono-oxygénase (AMO). L'acétylène est un outil pour évaluer l'intensité de la dénitrification sur le terrain et dans une culture, car il conduit à une accumulation mesurable du gaz N_2O. Un inhibiteur très classique de l'ammoniac mono-oxygénase est la nitrapyrine. Cet inhibiteur est en fait un agent "multicarte" car il inhibe d'autres *activités enzymatiques**. On continue à passer au crible d'autres inhibiteurs potentiels **[46]**. La réaction **11** seraitlégèrement stimulée par l'acétylène. Le dioxyde formé (NO_2) [5] est capable de fonctionner expérimentalement comme accepteur d'électrons au même titre que le

4 - L'enzyme (EC 1.7.7.1) est assimilarice, elle a été étudiée notamment chez les végétaux.

5 - On peut obtenir le dioxyde par action de l'acide nitrique dilué sur des copeaux de cuivre. L'acide agit ici comme oxydant, génère NO qui s'oxyde à son tour à l'air en NO_2.

nitrite ou le nitrate (étape **12**). Le dioxyde d'azote sous l'éclairement solaire réagit avec l'oxygène de l'air et les vapeurs d'hydrocarbures pour engendrer de l'ozone et différents produits irritants contribuant à la pollution des villes et aux fameux « smog » au-dessus des grandes agglomérations. Nous laisserons de côté le tétraoxyde de diazote (N_2O_4) formé par dimérisation de NO_2, produit essentiellement par l'activité humaine. Il a des applications dans la fabrication de carburants pour fusées spatiales.

On terminera cette section en signalant qu'il existe une dénitrification chez les champignons et levures. Elle est révélée par l'émission de NO, N_2O et N_2, mais les connaissances sont plus récentes. Il est possible que la réduction du nitrate dans les sols et sédiments corresponde à un métabolisme de secours lorsque l'oxygène est limitant ou absent. Elle est pratiquée par des *Fusarium*, *Giberella*, *Penicillium*, *Aspergillus* et autres **[47]**. Certaines espèces vont jusqu'au stade N_2. Contrairement à une idée reçue, la respiration des champignons ne se limite donc pas à l'emploi d'O_2 comme accepteur, mais peut se tourner vers la dénitrification **[48]**. La production d'énergie chez les eucaryotes non photosynthétiques est tributaire de leurs mitochondries. Auraient-elles perdu leur ancien métabolisme anaérobie ? C'est possible, puisque les mitochondries de *Fusarium oxysporum* et *Cylindrocarpon tonkinense* sont capables de prendre en charge une véritable dénitrification sur malate ou pyruvate comme substrat, en faisant de l'ATP par couplage avec les transferts d'électrons **[49]**. Ces mitochondries "anaérobies" sont peut-être les vestiges d'une situation ancestrale, car elles sont munies des enzymes nécessaires à la réduction des différents oxydes d'azote et fonctionnent avec des chaînes d'oxydoréduction standards sensibles aux inhibiteurs habituels du type antimycine ou roténone. L'existence de ces mitochondries spécialisées agrandit notre vision de la biologie des milieux privés d'air. Ce que l'on croyait être l'apanage des procaryotes appartient aussi aux champignons et aux levures. On peut s'attendre de leur part à une grande diversité dans ce domaine et une intervention dans l'environnement plus grande que prévue.

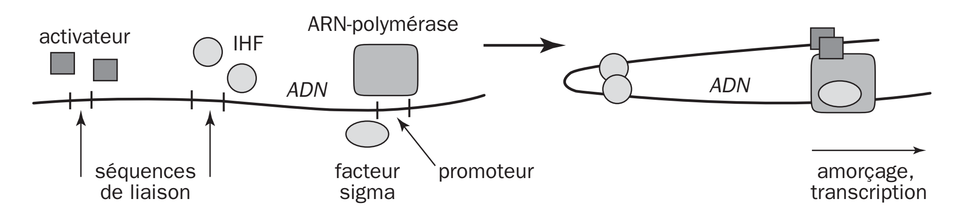
5.6 - LE PASSAGE À L'ANAÉROBIOSE

Puisque l'oxygène moléculaire est l'accepteur respiratoire le plus favorable sur le plan énergétique, il remporte la préférence sur tous les autres accepteurs possibles quand il est présent. Sa disparition nécessite une révision rapide du métabolisme vers des respirations de remplacement, et nous savons que la dénitrification est l'une des solutions possibles. Rappelons le principe général de cette conversion métabolique. Une régulation d'envergure se fait au niveau de la transcription de l'ADN et se traduit par l'expression de nouvelles familles de gènes, alors que d'autres sont mis en veilleuse. La transition se fait avec des modalités diverses selon les espèces et nécessite typiquement deux mécanismes moléculaires :

- la détection du signal physiologique, qui est ici le taux d'oxygène ;
- l'activation de la transcription au niveau des gènes concernés en fonction de la valeur du signal.

Pour simplifier à l'extrême : un capteur, un disjoncteur. Ces deux fonctions sont assurées le plus souvent par deux protéines distinctes, mais il arrive qu'une même protéine cumule les deux opérations. Un principe simple en apparence. Malheureusement nous serons vite confrontés à des situations plus compliquées dont la recherche est loin d'avoir exploré toutes les avenues.

On sait que la transcription catalysée par l'ARN-polymérase démarre au niveau d'un promoteur reconnu par un facteur d'amorçage (ou facteur sigma). L'efficacité de l'amorçage est variable et dépend de la nature du promoteur ou d'autres facteurs comme la conformation locale de la double hélice d'ADN. Souvent la triple association polymérase-sigma-ADN n'est pas suffisante, et c'est justement ce qui se passe pour la plupart des gènes du métabolisme azoté. L'apport d'une protéine supplémentaire est alors requis. Ce nouveau facteur est un activateur de transcription. Dans le cas le plus simple, l'activateur s'installe sur l'ADN en amont immédiat du promoteur. Dans d'autres cas l'activateur s'associe à l'ADN à une certaine distance en amont du promoteur, et entre en contact avec la polymérase à la faveur d'une déformation de la double hélice. C'est le principe déjà entrevu et symbolisé par un petit dessin :



Protéines auxiliaires (principe)

De nombreux gènes du métabolisme azoté sont transcrits à partir de promoteurs appartenant à une même famille et reconnus par un facteur sigma spécialisé, sigma-54 ou RpoN. La séquence consensus reconnue est TGGCACxxxxxTTGCA allant des positions – 12 à – 24 (les positions GG et GC placées aux extrémités sont absolument nécessaires). Sigma-54 n'est généralement pas capable d'amorcer tout seul la transcription. Des activateurs supplémentaires sont nécessaires et se fixent en amont de la zone reconnue par sigma-54. Ils entrent en contact avec l'ARN-polymérase à la faveur du repli de la double chaîne d'ADN sur elle-même, favorisée par la protéine appelée **IHF**. En somme la polymérase ne commence son véritable travail qu'après en avoir reçu l'autorisation. L'activateur fait office de disjoncteur qui allume ou éteint l'expression des gènes que la polymérase est chargée de transcrire. Ce disjoncteur reconnaît lui-même une condition physiologique particulière, ou ne le fait que par l'intermédiaire d'une protéine fonctionnant comme capteur (ou détecteur) sensible à un signal spécifique. Le contrôle s'effectue alors par la collaboration de deux protéines, un capteur et un activateur capable de se lier à l'ADN.

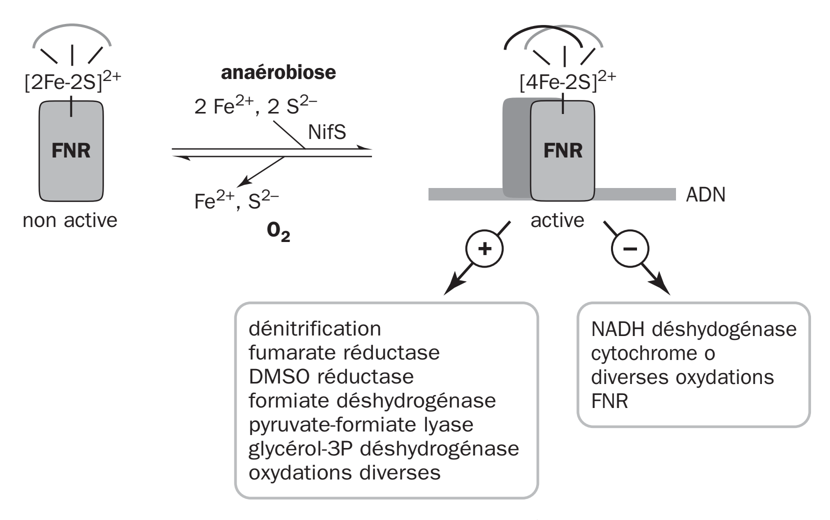
Examinons la dénitrification proprement dite. L'objectif de base est de compenser par un oxyde d'azote la disparition de l'oxygène comme accepteur respiratoire. C'est là qu'intervient la **protéine FNR**. C'est une protéine activatrice dont la

fonction est de mettre en route l'expression d'une foule de gènes concernés par la vie en anaérobiose, ou inversement de les mettre en veilleuse après l'arrivée de l'oxygène. Dans *Escherichia coli* où FNR a été découverte initialement, la régulation globale dont elle est responsable ne commande pas moins de 125 gènes et on commence à avoir une idée assez précise de son fonctionnement **[50]**. FNR pratique le cumul des mandats, car elle est à la fois capteur et activateur **[51]**. Au repos c'est une protéine monomérique avec deux zones essentielles. La partie N-terminale de la séquence a un domaine fer-soufre jouant le rôle de détecteur, et la partie C-terminale possède une région responsable de l'attachement à l'ADN. La FNR de *E. coli* présente de fortes similitudes structurales avec une autre protéine activatrice qui est ***CRP**** dans le domaine qui s'attache à l'ADN. La protéine FNR est un peu l'archétype d'une famille de régulateurs, dont font partie les protéines FixK de la section précédente. La même architecture et des homologies de séquence se retrouvent dans tous ces régulateurs, ce qui ne veut pas dire que le mode de détection du signal soit identique dans tous les cas.

Comment la protéine FNR s'aperçoit-elle qu'il n'y a plus d'oxygène ? Elle est présente à un taux faible mais pratiquement constant, que les cellules soient placées en aérobiose ou non. Elle ne s'attache pas à l'ADN sous forme monomérique. Elle devient activatrice sous forme d'un dimère, par association symétrique de deux chaînes identiques. La détection se fait donc par une transformation qui affecte la structure de FNR elle-même et non pas son abondance intracellulaire. La pièce maîtresse est un **noyau fer-soufre** de type $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ similaire à celui qu'on trouve dans bon nombre de ferrédoxines. Il est lié par 4 restes de cystéine dont trois sont dans la partie la plus N-terminale. Dans une ferrédoxine, le fer-soufre est alternativement oxydé ou réduit entre les états $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ et $[4Fe\text{-}4S]^{+}$, et lié à 4 cystéines. L'attachement dans FNR ne se fait pas avec quatre cystéines, mais sur un mode un peu différent. Le noyau sous forme oxydée, $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$, stabilise la protéine sous sa forme dimérique, celle qui active la transcription. Elle se fixe à l'ADN sur une séquence palindromique consensus, TTGATnnnATCAA, centrée à environ 41 bases en amont du point de départ de la transcription. La montée de l'oxygène va faire sauter cette association. Le noyau fer-soufre est fragile. Il est facilement détruit par O_2, et sa destruction rompt la forme dimérique de FNR, qui revenue à l'état monomérique est contrainte de quitter l'ADN. Un progrès majeur a été réalisé après clonage du gène, surexpression pour en avoir une quantité suffisante et purification conduite strictement à l'abri de l'air. La protéine est alors obtenue principalement sous forme de dimère, avec un fer-soufre par chaîne, et peut se lier à l'ADN **[52]**. La spectroscopie MOSSBAUER **[53]** suggère que O_2 déclenche la transformation des noyaux $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ en $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$, mais le mode exact n'est pas définitivement établi. On a supposé aussi qu'il pouvait se faire en $[3Fe\text{-}4S]^{+}$ et un ion Fe^{3+}, une conversion qui correspondrait à une oxydation avec perte de fer et provoquerait la dissociation du complexe FNR-ADN. La teneur en oxygène nécessaire pour supprimer de moitié le pouvoir activateur de FNR est très basse, de l'ordre de 0,1 à 0,5% de la teneur normale en équilibre avec l'air.

La transformation de FNR paraît réversible. La récupération après épuisement complet de l'oxygène suppose l'intervention d'un facteur enzymatique chargé de remodeler le noyau fer-soufre, et du même coup de restaurer la protéine. On pense

que cette fonction revient à la protéine **NifS**. L'oxygène a détaché FNR de l'ADN et la protéine NifS permet l'opération inverse. Le schéma est un modèle provisoire symbolisant le passage d'un état à l'autre. Il y a peut-être plusieurs formes non actives, [2Fe-2S] indiquée ici, [3Fe-4S] et une forme dépourvue de fer-soufre.



FNR alterne entre deux états

Parmi les facteurs de la dénitrification se trouvent des enzymes, des transporteurs, des systèmes de capture de métaux et de synthèse des cofacteurs… Les généticiens diraient que la commande de tout cela correspond à un ***régulon****. Par exemple dans le système à deux composants NarX/NarL, l'activateur NarL, renseigné par NarX, commande le régulon de l'utilisation du nitrate[6]. Un autre régulon commande l'utilisation du nitrite et se voit lui-même contrôlé en amont. Une supervision générale est effectuée par FNR, qui contrôle plusieurs régulons liés à la dénitrification, ainsi que d'autres opérations qui lui sont étrangères comme la réduction du fumarate, ou encore le fonctionnement de la pyruvate-formiate lyase. On dit que FNR est le régulateur d'un **modulon** ou système de régulation globale. Il existe donc une hiérarchie entre niveaux de régulation pour une optimisation des différentes voies. FNR est comparable à un disjoncteur général contrôlant un grand nombre de fonctions. Sur chaque ligne existent des disjoncteurs particuliers, sur lesquels sont branchés des circuits distincts.

Voici quelques exemples de protéines régulatrices adoptant une structure comparable (en particulier dans la partie liant l'ADN). Certaines reconnaissent directement l'oxygène (cas de FNR), d'autres sont activées au sein d'un système à deux composants (type FixK).

---

6 - *Comme dans un système classique à deux composants, NarX, qui reconnaît le nitrate, active la protéine NarL en la phosphorylant sur aspartate.*

Régulateur	Espèce bactérienne	Opérons cibles [7]	Détection par
FNR	*Escherichia coli*	*nar, nap, fdr, nir*	fer-soufre (O_2)
ANR	*Pseudomonas aeruginosa*	*nar, nir, nor,nos, arc*	fer-soufre (O_2)
FnrA	*Pseudomonas stutzeri*	*arc, ccp*	fer-soufre (O_2)
FnrP	*Paracoccus denitrificans*	*nar, cco, ccp*	fer-soufre (O_2)
NNR	*Paracoccus denitrificans*	*nir, nor*	oxyde nitrique **[54]**
$FixK_2$	*Bradyrhizobium japonicum*	*nar, rpoN* [8]*, fix*	FixJ/FixL (O_2)
DNR	*Pseudomonas aeruginosa*	*nir, nor*	nitrite
AadR	*Rhodopseudomonas palustris*	*nar, nir*	fer-soufre (O_2)

On connaît actuellement une bonne cinquantaine de protéines régulatrices de la superfamille FNR-CRP. La comparaison des séquences montre qu'il s'agit d'une diversification évolutive à partir de la même solution ancestrale **[55]**. La plasticité structurale et évolutive du modèle qu'elles représentent est remarquable. Il a été possible par mutation d'obliger CRP à reconnaître des promoteurs activés par FNR, et réciproquement **[56]**, ce qui ne semble possible que si les modes d'attachement à l'ADN sont pratiquement les mêmes. À cela s'ajoutent diverses fonctionnalités : allongement de la séquence et modifications locales pour recevoir un noyau fer-soufre (FNR), création d'un site d'affinité pour des oxydes d'azote, ou un nucléotide (AMP cyclique), acquisition d'un site phosphorylable (FixK), insertion d'une porphyrine... La reconnaissance de O_2 comme effecteur apparaît comme un cas particulier, elle n'est effective que pour certains membres de cet ensemble. Se rattachent aussi à cette grande famille d'autres protéines montrant une ressemblance structurale avec FNR, notamment NarL dont il sera question plus loin **[57]**.

Le **signal O_2** est-il toujours reconnu par un noyau fer-soufre ? La réponse est négative. Parmi les autres protéines qui partagent avec la FNR du colibacille des ressemblances de séquence et de structure, on distingue au moins deux groupes : le **type FNR**, dont le système de reconnaissance est fondé sur un noyau fer-soufre, et le **type FixK** utilisant une porphyrine. Dans le premier existe ce qu'on appelle une "signature" (un consensus) dans la partie N-terminale de la séquence présumée recevoir le noyau fer-soufre : Cys-x_2-Cys-x_5-Cys (FNR, ANR) ou Cys-$x_{2\text{-}3}$-Cys-x_7-Cys (AadR). Cette signature est absente dans le deuxième groupe contenant les DNR et les FixK, apparemment dépourvues de fer-soufre, et présentes dans les bactéries fixatrices d'azote. Elles reçoivent leurs ordres dans un système régulateur à deux composants : FixL/J. Nous avons déjà rencontré FixL à propos de la fixation de l'azote. Rappelons que cette protéine héminique fixe O_2 sur le fer(II) de sa porphyrine. En oxygène absent ou faible, FixL phosphoryle FixJ, qui active à son tour $FixK_2$. Le véritable activateur est $FixK_2$ **[58]**.

---

7 - *nar : nitrate réductase membranaire. nar : idem, périplasmique. fdr : fumarate réductase. nir : nitrite réductase. nor : NO réductase. nos : N_2O réductase. arc : catabolisme de l'arginine. ccp : cytochrome c peroxydase. cco : cytochrome cbb oxydase. rpoN : expression des gènes fix (fixation de l'azote) et nif (nitrogénase).*

8 - *Appelé aussi NtrA.*

Nous avons maintenant l'habitude des protéines régulatrices qui font office de disjoncteur sur l'ADN. Elles autorisent ou non le démarrage d'une transcription. L'association sur l'ADN près du promoteur peut se faire en un site unique ou sur des sites secondaires. Les règles d'association sur l'ADN sont presque toujours du même type. La séquence reconnue est palindromique et obéit à des critères de dimension bien définis. La protéine s'installe sous forme d'un dimère et l'ADN subit au cours de l'association une courbure ou une déformation plus ou moins prononcée qui est essentielle lorsque le site de liaison est éloigné du promoteur. Le processus a besoin de facteurs auxiliaires tels que **IHF**, qui facilitent la torsion de la double hélice.

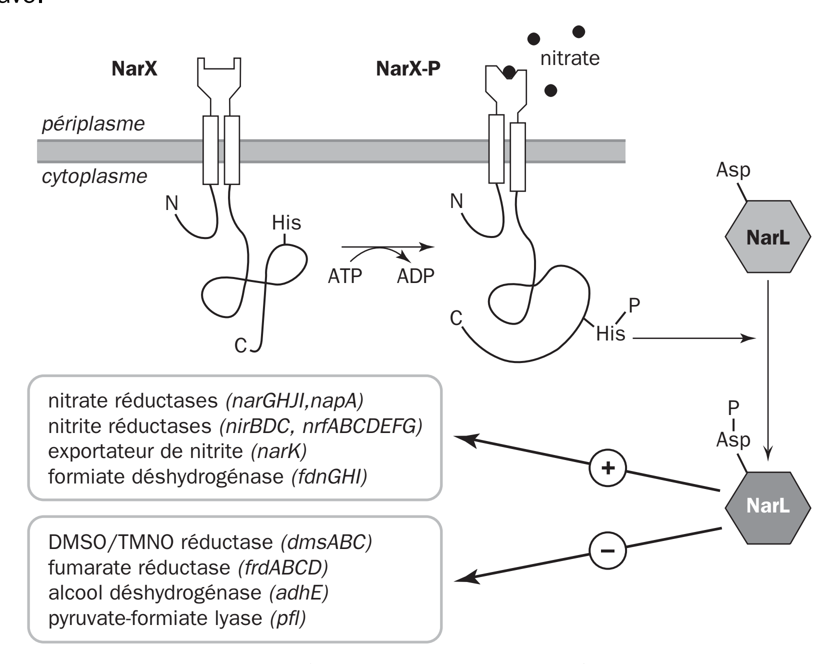
Les protéines du type NtrA ou FNR ont-t-elles une valeur universelle ? On sait déjà que non. *Bacillus subtilis* est une espèce Gram-positive sporulante longtemps considérée comme exclusivement aérobie. L'intervention d'un régulateur tel que FNR ne devrait pas être nécessaire. En fait ces bactéries ont également une aptitude à se développer en anaérobiose, notamment par réduction du nitrate. Elles assimilent l'azote ammoniacal uniquement par la glutamine synthétase, et celle-ci n'apparaît pas régulée comme celle du colibacille. Le contrôle s'exerce par au moins trois protéines régulatrices, TnrA, GlnR et CodY, qui ont chacune leur secteur d'influence sur les gènes du métabolisme azoté en fonction des conditions physiologiques **[59]**. CodY est un répresseur dans les cellules en multiplication rapide sur des acides aminés comme source azotée, GlnR réprime en excès d'azote dans le milieu, TnrA active ou réprime quand les ressources en azote sont limitées. Le plan directeur des régulations est rendu complexe chez *B. subtilis* du fait que les enzymes de dégradation des acides aminés servant de source d'azote ont un rôle clé à la fois au cours de la sporulation et de la germination des spores.

5.7 - UNE OPTIMISATION TRÈS POUSSÉE

L'alternance entre aérobiose et anaérobiose est chaque fois une véritable crise dans la vie cellulaire. Elle provoque un profond bouleversement dans l'expression de nombreux gènes, modifie des enzymes du métabolisme et les chaînes de transport d'électrons. La protéine FNR contribue à gérer cette crise. En fait elle n'est pas seule à le faire. Si le nitrate et autres oxydes de l'azote sont des accepteurs respiratoires, c'est-à-dire des succédanés de l'oxygène lorsque celui-ci fait défaut, il existe d'autres accepteurs possibles en fonction des disponibilités. Nous les retrouverons par la suite : diméthyl-sulfoxyde, triméthylamine N-oxyde (TMMO), fumarate (chez le colibacille), et les très importants ions sulfate chez les sulfatoréducteurs. Ces différents accepteurs ne sont pas tous aussi favorables sur le plan thermodynamique. Cela dépend du potentiel d'oxydoréduction de l'accepteur et du mécanisme concerné. Lorsque plusieurs possibilités s'offrent simultanément, les bactéries ont intérêt à privilégier un accepteur efficace plutôt qu'un autre moins performant. Un bon accepteur est le nitrate, dont le potentiel est bien plus favorable que celui du fumarate. Encore faut-il qu'il y ait du nitrate, sinon la bactérie serait condamnée à gaspiller son énergie en fabriquant des enzymes inutiles. Il y a

donc un choix qui est assez bien connu pour le colibacille. Lorsqu'il est placé en anaérobiose, FNR donnera le feu vert pour une activation en bloc des gènes de la dénitrification, mais d'autres régulateurs vont ouvrir ou fermer les voies autorisées par FNR en fonction des facteurs disponibles et de leur efficacité. Par exemple l'utilisation du fumarate (notamment l'opéron *frdABCD* de la fumarate réductase) ne sera mise en route qu'en anaérobiose et en absence de nitrate. Si ce dernier est disponible, la fumarate réductase sera au contraire réprimée pour donner la préférence à la dénitrification. Le choix des différentes voies autorisées par FNR nécessite donc des contrôles secondaires. Une régulation centrale de nombreux opérons par FNR, des régulations satellites sur les opérons individuels.

Voici comment s'exerce le choix entre nitrate et fumarate. Le colibacille peut utiliser un deuxième régulateur de transcription, qui est **NarL**. Cette protéine fait partie d'un système à deux composants, soit un capteur (NarX) et un activateur (NarL). NarX est chargé de détecter s'il y a du nitrate ou pas. Dans le premier cas, il agit sur NarL qui renforce l'activation des gènes de l'utilisation du nitrate à condition que l'opération soit autorisée par FNR (du nitrate, mais pas de O_2). Mais voici le point important : la protéine NarL, au lieu de favoriser l'expression des gènes du fumarate, fait exactement l'inverse, entrave leur expression et fonctionne comme répresseur. Conséquence : le nitrate sera réduit en priorité. Le nitrate une fois épuisé, NarL perdra son affinité pour l'ADN et cessera son action. En l'absence de O_2, FNR activera l'expression des gènes du fumarate sans que NarL n'y mette d'entrave.



NarX reconnaît le signal nitrate et régule NarL

La protéine **NarX est membranaire**, elle comporte une partie qui dépasse dans le périplasme et reconnaît la présence du nitrate à l'extérieur, ainsi que le nitrite. Elle

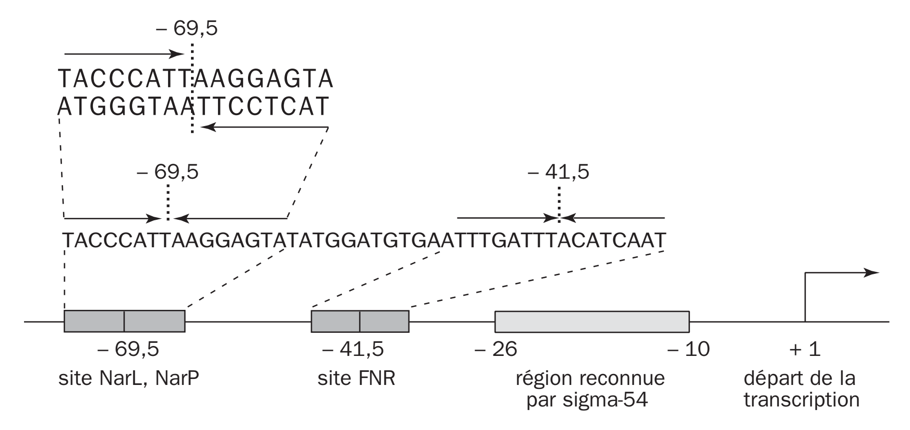
possède aussi un domaine cytoplasmique porteur de l'activité autokinase comme dans tous les systèmes à deux composants. L'autophosphorylation de NarX s'effectue en continu même en l'absence du signal nitrate, elle est seulement accélérée dans un rapport de 2 à 10 après arrivée du nitrate. NarX phosphoryle NarL après s'être phosphorylée elle-même à un taux suffisant. L'existence d'un taux de base permanent autorise peut-être une plus grande rapidité de réponse à l'arrivée du signal. Par mutation de la séquence qui dépasse dans le périplasme, on peut créer une situation où NarX s'autophosphoryle au taux maximum et transmet le signal même quand il n'y a pas de nitrate (verrouillage ON), alors que d'autres mutations ont l'effet inverse (verrouillage OFF). La reconnaissance du nitrate est donc à l'origine d'un changement de conformation qui se transmet à travers la membrane et agit sur le taux d'autophosphorylation **[60]**. NarX devenu NarX-phosphate agit comme une kinase, elle transmet son phosphate à NarL (→ NarL-phosphate). Ces deux protéines ont été caractérisées d'abord dans le colibacille, mais se retrouvent sous des formes voisines chez les différentes espèces bactériennes dénitrifiantes étudiées.

Cette régulation est en double chez le colibacille. Un système NarQ/NarP est homologue du précédent. Les deux systèmes détectent à la fois le nitrate et le nitrite. Le partage des compétences réelles entre les deux tandems régulateurs, NarX/NarL et NarQ/NarP, n'est pas clairement élucidé. La réponse au nitrate est la plus vive, elle est déclenchée pour un seuil de 5 µM dans NarX (avec une phosphorylation à 50% pour 35 µM) contre des doses au moins 50 fois plus élevées avec le nitrite **[61]**. Il y a probablement des différences d'action sur plusieurs voies métaboliques cellulaires, permettant un réglage fin de la machinerie générale. La liaison phosphate sur ces protéines est labile, ce qui garantit qu'en cas de disparition du signal le système retourne à la case départ. Sinon NarL-phosphate s'associe à l'ADN sur un mode remarquable. La reconnaissance s'effectue sur un site heptamérique (séquence de 7 nucléotides), de type TACYNMT (Y est C ou T, M est A ou C, N est n'importe quel nucléotide). Or il y a plusieurs heptamères échelonnés en amont du gène régulé. Ces heptamères se présentent en motifs isolés ou par paires. Par exemple en amont du gène *narG*, qui est celui de la nitrate réductase, il n'y a pas moins de 8 sites heptamères allant des positions – 57 à – 208[9]. La transcription en aval est donc le résultat d'un jeu subtil de reconnaissance du promoteur, d'interaction avec l'ARN-polymérase, de l'intervention d'autres protéines (qui facilitent ou entravent les associations), d'une courbure de l'ADN (induite en particulier par IHF). Une illustration montre la disposition constatée chez le colibacille en amont de l'opéron *nir* qui code pour une nitrite réductase cytoplasmique. L'activation s'effectue à la fois par la disparition d'O_2 (reconnue par FNR) et par la présence de nitrite (NarL et NarQ).

Ce système a été étudié en détail en Angleterre par le groupe de BUSBY (WU et coll **[62]**). De nombreuses mutations ont été introduites à des positions comprises entre – 150 et – 11 en amont du départ de la transcription, tout en faisant varier la distance entre les sites de FNR et de NarL. L'amorçage par sigma-54 (RpoN) ne

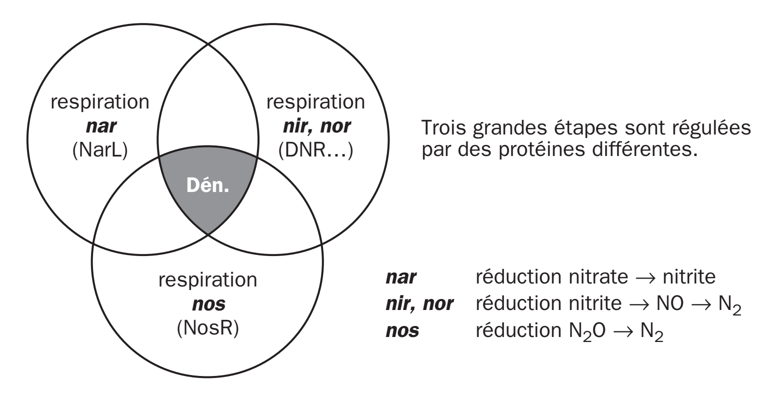
9 - *Positions repérées par la technique des empreintes à la Dnase I (footprinting).*

peut pas se faire sans l'association à l'ADN de NarL (ou de NarP) et de FNR. Les réglages sont complexes. FNR serait l'activateur principal de la transcription, mais son action serait contrecarrée par une ou plusieurs protéines se liant spécifiquement en amont du site de NarL et agissant comme répresseurs. L'une de ces protéines a été identifiée (Fis) et se lie vers – 140. Le rôle de NarL serait d'écarter ces gêneurs et de dégager FNR de toute inhibition. Cette interprétation, qui n'est probablement pas généralisable à d'autres opérons, montre que l'intervention des régulateurs sur l'expression des gènes qu'ils gouvernent peut obéir à des règles variées et parfois compliquées.



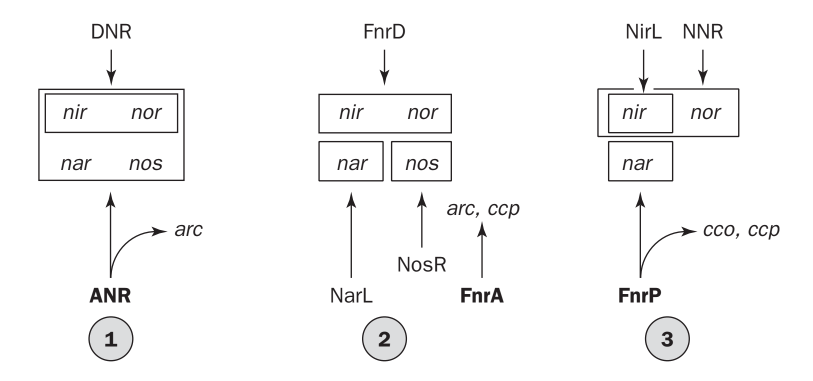
Région régulatrice en amont de l'opéron nar

En fonction de tout cela, on voit à nouveau qu'il existe une hiérarchie dans les protéines régulatrices. Après les régulateurs comme FNR qui commandent des grandes options du métabolisme, d'autres protéines modulent les détails, et leurs organisation dépend de l'adaptation physiologique des espèces. Le colibacille, contient plus de cinquante protéines régulatrices et les régions reconnues par elles sur l'ADN, non transcrites, correspondent à une part importante du génome total **[63]**. Le diagramme inspiré de WALTER ZUMFT (1997) montre comment une dénitrification complète, symbolisée par la zone d'intersection ombrée, est obtenue par le fonctionnement simultané de plusieurs régulons, représentés chacun par un cercle.



Dénitrification complète (Dén.)

La dénitrification est une fonction modulaire correspondant à au moins trois respirations anaérobies différentes qui sont inégalement représentées selon les espèces. Par exemple, le passage de N_2O à N_2 manque chez *Escherichia coli*. Malheureusement il est très difficile de donner un plan absolument général. Le schéma suivant, inspiré à nouveau de ZUMFT (1997), a le mérite de comparer trois solutions parmi celles qui sont possibles chez les Gram-négatives, correspondant au tableau des protéines type FNR rencontré plus haut. Ce sont seulement trois exemples, un échantillonnage sûrement insignifiant face à l'énorme diversité naturelle. Un rectangle du tableau correspond aux opérons activés par un même régulateur (flèche).



Trois solutions...

Ces quelques indications nous montrent la complexité des régulations cellulaires en fonction de l'espèce et de la nature du milieu. Elles n'ont ici qu'une valeur d'exemple. Ce que nous voyons est une optimisation poussée qui est le fruit d'une longue évolution. La population des micro-organismes dans les milieux naturels est le siège de compétitions où chaque forme s'efforce d'optimiser son métabolisme. Il en résulte une grande plasticité opérationnelle autorisant des biodégradations anaérobies dans une gamme étendue de conditions différentes.

Pour jeter un regard plus synthétique sur ces questions importantes où s'entrecroisent beaucoup de données, un résumé rassemblera les quatre mécanismes de base qui permettent aux cellules anaérobies facultatives d'adapter leur métabolisme en passant de l'aérobiose à l'anaérobiose, et vice versa, ou encore de résister à la présence de l'oxygène. Les deux premiers sont des modulons, ils concernent chacun une palette de fonctions différentes. Le troisième et le quatrième sont des régulons, dont la vocation est plus spécialisée. À quelle teneur du milieu en O_2 l'interconversion se fait-elle ? Elle est forcément variable avec les espèces, mais rappelons que la limite se situe vers 0,1 à 0,5% du taux maximum de O_2 en équilibre avec l'air.

Régulateur	Détection	Fonction
FNR	Oxydation et destruction réversible de $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ par O_2.	Utilisation du nitrate, du nitrite et du fumarate comme accepteurs. Agit comme activateur ou répresseur, interagit avec la sous-unité α de l'ARN-polymérase. La plupart des opérons contrôlés le sont aussi par d'autres protéines. Réprime le gène *fnr*, active *arcA*.
ArcA	Phosphorylation de ArcB en ArcB-P stimulée par divers métabolites (lactate, pyruvate…) et un potentiel redox bas.	ArcA phosphorylée en ArcA-P (système à deux composants), se lie à l'ADN et réprime en général les gènes impliqués dans l'aérobiose. Déphosphorylation par ArcB non phosphorylée.
SoxR,S	SoxR avec 2 $[2Fe\text{-}2S]^{+}$ oxydés par superoxyde. Taux cellulaire constant. Lié à l'ADN.	SoxR oxydée stimule l'amorçage par l'ARN-polymérase et active la transcription de *soxS*. SoxS se lie aux promoteurs des gènes de défense contre le superoxyde et y stabilise l'attachement de la polymérase
OxyR	Oxydation de OxyR sur thiols en présence de H_2O_2. Taux cellulaire constant.	OxyR autorégule sa propre expression, régule 20-30 gènes concernés par la résistance aux peroxydes.

CONCLUSION

La dénitrification pratiquée par les bactéries apporte une solution puissante au recyclage des matières carbonées en anaérobiose tant que le nitrate est présent. Cette activité donne lieu à des réglages sophistiqués sur le plan de l'expression des gènes, car elle est tributaire de la production de nitrate par oxydation de l'ammoniac, et cette partie du cycle de l'azote fait intervenir une compétition avec les plantes et les champignons. Les bactéries dénitrifiantes sont souvent capables d'effectuer en anaérobiose de nombreuses biodégradations et se montrent capables d'utiliser des accepteurs de remplacement quand le nitrate fait défaut. La dénitrification reste dans tous les cas un maillon quasi essentiel dans les biodégradations anaérobies.

RÉFÉRENCES

[1] FAURE G (1991) *Principles and Applications of Inorganic Geochemistry*, Macmillan Publishing Co., New York.

[2] ABER JD (1992) *Trends in Ecology Evolution* **7** : 220-223.

[3] VILLAREAL TA, PILSKALN C, BRZEZINSKI M, LIPSCHULTZ F, DENNETT M & GARDNER GB (1999) *Nature* **397** : 423-425.

[4] ZEHR JP, WATERBY JB, TURNER PJ, MONTOYA JP, OMOREGLE E, STEWARD GF, HANSEN A & KARL DM (2001) *Nature* **412** : 635-638.

[5] NEYRA C, DÖBEREINER J, LALANDE R & KNOWLES R (1977) *Can. J. Microbiol.* **23** : 300-305 ; NELSON LM & KNOWLES R (1977) *Can. J. Microbiol.* **24** : 1395-1403.

[6] ZHULIN IB, BESPALOV VA, JOHNSON MS & TAYLOR BL (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 5199-5204 ; MARCHAL K, SUN J, KEIJERS V, HAAKER H & VANDERLEYDEN J (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 5689-5696.

]7] VARGAS C, WU G, DELGADO MJ, POOLE RK & DOWNIE JA (1996) *Microbiology* **142** : 41-46.

[8] BAKER DD & SCHWINTZER CR (1990) *Introduction, The biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, Academic Press : 1-13.

[9] SIMONET P, NGUYEN TL, TESSIER DU CROS E & BARDIN R (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 2500-2503.

[10] PUPPO A, DIMITRIJEVIC L & RIGAUD J (1989) *Physiologia Plantarum* **77** : 308-311.

[11] LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON R & LAMB C (1994) *Cell* **79** : 583-593.

[12] KIM J & D.C. REES (1992) *Nature* **360** : 553-560 ; KIM J & coll. (1993) *Biochemistry* **32** : 7104-7115.

[13] SEEFELDT LC, RASCHE ME & ENSIGN SA (1995) *Biochemistry* **34** : 5382-5389.

[14] SCHNEIDER K, GOLLAN U, DRÖTTBOOM M, SELSEMEIER-VOIGT S & MÜLLER A (1997) *Eur. J. Biochem.* **244** : 789-800.

[15] LOWE DJ & THORNELEY RN (1984) *Biochem. J.* **224** : 877-886 ; THORNELEY RN & LOWE DJ (1984) *Biochem. J.* **224** : 887-894 ; LOWE DJ & THORNELEY RN (1984) *Biochem. J.* **224** : 895-901.

[16] SEEFELDT LC, RASCHE ME & ENSIGN SA (1995) *Biochemistry* **34** : 5382-5389 ; RASCHE ME & SIEFELDT LC (1997) *Biochemistry* **36** : 8574-8585.

[17] JACOBSON MR, BRIGLE KE, BENNETT LT, SETTERQUIST RA, WILSON MS, CASH VL, BEYNON J, NEWTON WE & DEAN DR (1989) *J. Bacteriol.* **171** : 1017-1027 ; PAU RN (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14** : 183-186.

[18] LEE S, RETH A, MELETZUS D, SEVILLA MV & KENNEDY C (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 7088-7091.

[19] HOMER MJ, PAUSTIAN TD, SHAH VK & ROBERTS GP (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 4907-4910.

[20] NISHIO K & NAKAI M (2000) *J. Biol. Chem.* **275** : 22615-22618 ; LEIMKÜHLER S & RAJAGOPALAN KV (2001) *J. Biol. Chem.* **276** : 22024-22031.

[21] LEE SH, PULAKAT L, PARKER KC & GAVINI N (1998) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **244** : 498-504.

[22] BARRETT J, RAY P, SOBCZYK A, LITTLE R & DIXON R (2001) *Mol. Microbiol.* **39** : 480-493.

[23] REYES-RAMIREZ F, LITTLE R & DIXON R (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 3076-3082.

[24] GOVANTES F, MOLINA-LOPEZ JA & SANTERO E (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 6817-6823.

[25] DIXON R (1998) *Arch. Microbiol.* **169** : 371-380 ; MONEY Y, BARRETT J, DIXON R & AUSTIN S (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 1359-1368.

[26] EARL CD, RONSON CW & AUSUBEL FM (1987) *J. Bacteriol.* **169** : 1127-1136.

[27] GONG W, HAO B, MANSY SS, GONZALEZ G, GILLES-GONZALEZ MA & CHAN MK (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci* **95** : 15177-15182.

[28] MORENO-VIVIAN C & FERGUSON SJ (1998) *Molec. Microbiology* **29** : 664-666.

[29] SABATY M, GAGNON J & VERMEGLIO A (1994) *Arch. Microbiol.* **162** : 335-343.

[30] STEWART V (1988) *Microbiol. Rev.* **52** : 190-232 ; HOCHSTEIN LI & TOMLINSON GA (1988) *Annu. Rev.* **42** : 231-261.

[31] CRAWFORD NM & ARST JR. HN (1993) *Annu. Rev. Genet.* **27** : 115-146 ;
LIN JT & STEWART V (1998) *Adv. Microb. Physiol.* **39** : 1-30.

[32] KROTSKY A & WERNER D (1987) *Arch. microbiol.* **147** : 48-57.

[33] STRAUB KL,BENZ M, SCHINK B & WIDDEL F (1996) *Appl. Environ. Microbiol*. **62** : 1458-1460.

[34] CARLSON CA & INGRAHAM JL (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* **45** : 1247-1253 ;
BRAUN C & ZUMFT WG (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 2394-2397.

[35] CARTER JP, HSAIO YH, SPIRO S & RICHARSON DJ (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 2852-2858.

[36] COLE J (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* **136** : 1-11.

[37] HOFFMANN T, FRANKENBERG N, MARINO M & JAHN D (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 186-189.

[38] POTH M & FOCHT DD (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* **49** : 1134-1141 ;
POTH M (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **52** : 957-959.

[39] SCHMIDT I & BOCK E (1997) *Arch. Microbiol.* **167** : 106-111 ;
ZART D, BOCK E (1998) *Arch. Microbiol.* **169** : 282-286.

[40] DAUM M, ZIMMER W, PAPEN H, KLOOS K, NAWRATH K & BOTHE H (1998)
Curr. Microbiol. **37** : 281-288.

[41] JETTEN MS, DE BRUIJN P & KUENEN JG (1997) *Antonie Van Leeuwenhoek* **71** : 69-74.

[42] ANDERSON IC, POTH M, HOMSTEAD & J, BURDIGE D (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3525-3533 ;
ZART D & BOCK E (1998) *Arch. Microbiol.* **169** : 282-286.

[43] KUAI L & VERSTRAETE W (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4500-4506.

[44} CONRAD R (1996) *Microbiological Rev.* **60** : 609-640.

[45] HYMAN MR & ARP DJ (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 4974-4979.

[46] KEENER WK, RUSSELL SA & ARP DJ (1998) *Bichim. Biophys. Acta* **1388** : 373-385.

[47] BLEAKLEY BH & TIEDJE JM (1982) *Appl. Environ. Microbio.* **44** : 1342-1348 ;
BURTH L, BENCKISER G & OTTO JCG (1982) *Naturwissenschaften* **69** : 598-599 ;
SHOUN H, KIM DH, UCHIYAMA H & SUJIYAMA J (1982) *FEMS Microbiol. Lett.* **94** : 277-281 ;
NAKAHARA K, TANIMOTO T, HATANO K, USUDA K & SHOUN H (1993) *J. Biol. Chem.* **268** : 8350-8355 ;
USUDA K, TORITSUKA N, MATSUO Y, KIM DH & SHOUN H (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 883-889.

[48] SHOUN H, KIM DH, UCHIYAMA H & SUGIYAMA J (1992) *FEMS Microbiol. Lett.* **73** : 277-281.

[49] KOBAYASHI M, MATSUO Y, TKIMOTO A, SUZUKI S, MARUO F & SHOUN H (1996)
J. Biol. Chem. **271** : 16263-16267.

[50] SAWERS RG, ZEHELEIN E & BÖCK A (1988) *Arch. Microbiol.* **149** : 240-244 ;
KILEY PJ & BEINERT H (1999) *FEMS Microbiol. Rev.* **22** : 341-352.

[51] SPIRO S & GUEST JR (1990) *FEMS Microbiol. Rev.* **75** : 399-428 ;
UNDEN G & SHIRAWSKI J (1997) *Mol. Microbiol.* **25** : 205-210.

[52] LAZAZZERA BA, BEINERT H, KHOROSHILOVA N, KENNEDY MC & KILEY PJ (1996)
J. Biol. Chem. **271** : 2762-2768.

[53] POPESCU CV, BATES DM, BEINERT H, MÜNCK E & KILEY PJ (1998)
Proc. Natl. Acad. Sci. **95** : 13431-13435 ;
KILEY PJ & BEINERT H (1999) *FEMS Microbiol. Rev.* 22 : 341-352.

[54] HASEGAWA N, ARAI H & IGARASHI Y (1998) *FEMS Microbiol. Lett.* 166 : 213-217.

[55] FISCHER HM (1994) *Microbiol. Rev.* **58** : 352-386 ;
VOLLACK KU, HÄRTIG E, KÖRNER H & ZUMFT WG (1999) *Molec. Microbiol.* **31** : 1681-1694.

[56] SAWERS G, KAISER M, SIRKO A & FREUNDLICH M (1997) *Molec. Microbiol.* **23** : 835-845.

[57] BAIKALOV L, SCHRÖDER I, KACZOR-GRZESKOWIAK M, GRZESKOWIAK K, GUNSALUS RP & DICKERSON RE (1996) *Biochemistry* **35** : 11053-11061.

[58] GILLES-GONZALEZ MA, GONZALEZ G & PERUTZ MF (1995) *Biochemistry* **34** : 232-236.

[59] FISHER SH (1999) *Molecular Microbiol.* **32** : 223-232.

[60] CAVICCHIOLI R, CHIANG RC, KALMAN LV & GUNSALUS RP (1996) *Molec. Microbiol.* **21** : 901-911.

[61] LEE AI, DELGADO A & GUNSALUS RP (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 5309-5316.

[62] WU HC, TYSON KL, COLE JA & BUSBY SJB (1998) *Molecul. Microbiol.* **27** : 493-505.

[63] THIEFFRY D, SALGADO H, HUERTA AM & COLLADO-VIDES J (1998) *Bioinformatics* **14** : 391-400.

CHAPITRE 6
RÉDUCTION DES OXYDES D'AZOTE

Ce chapitre examine les enzymes qui transforment progressivement le nitrate en azote gazeux ou en ammoniac, par les étapes entrevues dans le chapitre précédent. On s'intéressera au mécanisme d'action des différentes réductases qui participent à la dénitrification, sans lesquelles, bien des biodégradations seraient impossibles. Les bactéries n'en ont pas l'exclusivité, et l'intervention des champignons sera évoquée en fin de chapitre.

6 – Réduction des oxydes d'azote

Le grand cycle de l'azote dans la nature comporte un va-et-vient entre la forme la moins oxydée, qui est l'ammonium, et la plus oxydée, qui est le nitrate. Le chapitre précédent nous a permis d'entrevoir quelques étapes fondamentales, comme la réaction de la nitrogénase. Ce nouveau chapitre est surtout enzymologique. Il tente de décrire le mécanisme d'action des différentes réductases qui participent à la dénitrification. En l'absence de celle-ci, bien des biodégradations deviendraient impossibles. La dénitrification fait partie des grands agents moteurs de la biochimie de l'environnement au même titre que les oxydations effectuées à l'aide de l'oxygène.

6.1 - Nitrate réductases et molybdène

À de rares exceptions près, la réduction biologique du nitrate, qu'elle soit respiratoire ou assimilatrice, a besoin de molybdène, un oligo-élément dont c'est l'une des contributions biologiques essentielles. Nous l'avons trouvé dans la nitrogénase, l'enzyme chargée de réduire le diazote en ammoniac. Le molybdène s'y rencontrait dans un noyau fer-soufre d'un type particulier, mais la nitrogénase est une exception parmi les enzymes à molybdène. Dans tous les autres cas où il intervient, le molybdène est logé dans un cofacteur nucléotidique. Les molybdo-enzymes sont nombreuses et variées. Le métal oscille entre les stades Mo(VI) et Mo(IV). Ce n'est que le trente-cinquième élément par ordre d'abondance dans la croûte terrestre et son importance biologique n'attire pas toujours l'attention qu'elle mériterait. On trouvera à la page suivante un petit tableau pour souligner le rôle de Mo dans la nature, nitrogénase exclue. Les réactions catalysées et des renseignements supplémentaires sont donnés en glossaire.

Il est à noter que le molybdène a son double qui est le tungstène. Ce métal a peut-être participé au développement de la vie dès les temps les plus anciens, car il se rencontre chez des bactéries réputées héritières des formes les plus primitives. Le tungstate est volontiers un inhibiteur des enzymes à molybdène, mais il est requis pour l'activité de certaines enzymes comme la formiate déshydrogénase des archaebactéries hyperthermophiles et des méthanogènes (voir *Tungstène**). Il existe donc des tungsto-enzymes, où le métal est lié à un cofacteur organique de même nature que celui qui renferme du molybdène **[1]**. Le cofacteur nucléotidique à molybdène fut découvert à l'origine dans un mutant nit-1 de *Neurospora crassa*. Sa nitrate réductase était sans action mais un mélange de constituants à faible masse

moléculaire pouvait la réactiver **[2]**. Les mutants de ce type ont souvent des défauts multiples au niveau des diverses enzymes maintenant répertoriées comme molybdo-enzymes. La nitrate réductase en fait partie. L'absence d'une nitrate réductase fonctionnelle entraîne une propriété caractéristique, qui est la résistance au chlorate ($NaClO_3$). L'explication est la suivante : la nitrate réductase réduit le chlorate en produits hautement toxiques, comme l'hypochlorite, et un défaut de cette enzyme met le mutant à l'abri de cet inconvénient.

Exemples	*Fonction catalytique*	*Localisation*
Nitrate réductase	Réduction des nitrates en nitrites	Procaryotes, végétaux
Séléniate réductase	Réduction des séléniates en sélénites	Bactéries (*Thauera*)
Arséniate réductase	Réduction des arséniates en arsénites	Bactéries (*Chrysiogenes*)
Formiate déshydrogénase	Oxydation du formiate en CO_2	Procaryotes
2-oxocarboxylate réductase	Réduction en (2R)-hydroxycarboxylate	Bactéries (*P. vulgaris*)
Sulfite réductase	Réduction de l'hydrosulfite en sulfure	Procaryotes, vég., an.
FormylMF* déshydrogénase	Oxydation du formylMF	Méthanogènes
TMAO** réductase	Réduction du TMAO en triméthylamine	Bactéries
DMSO*** réductase	Réduction du DMSO en diméthylsulfure	Bactéries
Polysulfure réductase	R. respiratoire du polysulfure en sulfure	Bactéries (*Wolinella*) **[3]**
Aldéhyde oxydoréductase	Conversion aldéhyde/acide	Bactéries (*Desulfovibrio*)
Sulfite oxydase	Oxydation du sulfite en sulfate	Animaux
Xanthine oxydase	Oxydation des purines en acide urique	Animaux, champignons
Aldéhyde oxydase	Oxydation des aldéhydes en acides	Animaux

* Formylméthanofurane, ** Triméthylamine-N-oxyde, *** Diméthylsulfoxyde

La structure chimique du cofacteur indiquée ici est celle du molybdoptérine-guanine dinucléotide ou **MGD**, présent dans *Rhodobacter sphaeroides* IL106 **[4]**. On reconnaît facilement la position du molybdate Mo(VI), lié à deux atomes de soufre (thiolène), et à droite la structure d'un nucléotide à guanine. Chez certaines espèces la guanine est remplacée par d'autres bases. Les cofacteurs portant du molybdène forment une famille de produits. La moitié gauche de la formule montrée ici comporte un cycle pyrane, qui est fermé par un atome d'oxygène. Le cycle peut être ouvert (avec apparition d'un OH) par un mécanisme d'oxydoréduction réversible qui ferait partie du fonctionnement du cofacteur.

Molybdoptérine-guanine dinucléotide (MGD)

L'ensemble du MGD est donc une structure formée par deux nucléotides soudés par leurs phosphates comme dans la structure du NAD ou du FAD. Les précurseurs sont deux unités indépendantes de GMP (guanosine-monophosphate). L'un de ces nucléotides est transformé en molybdoptérine sous l'action d'une synthase, qui introduit les atomes de soufre et autorise ainsi la mise en place du molybdate. L'opération est suivie de la soudure des deux nucléotides. Le molybdate est la principale source de Mo dans les eaux et le sol, où son abondance est modeste, soit 0,04 à 0,2 ppm, bien moindre que celle du fer ou du manganèse. L'accumulation des débris végétaux représente un réservoir de molybdène dans la biosphère. La teneur des tissus végétaux est en moyenne de 0,8 à 5 ppm. Une carence en molybdène des plantes cultivées est favorisée par un sol acide. La synthèse de ce cofacteur a été étudiée en détail dans *E. coli* et on suppose que son principe est généralisable aux autres espèces.

Grâce à des systèmes très efficaces de capture et de transport, la récupération de Mo par les bactéries n'est pas un problème physiologique majeur. La question a été examinée en détail chez plusieurs Gram-négatifs. Le transport est de type ABC, dont le représentant le plus étudié dans la recherche est celui du maltose **[5]**. Cette désignation fait allusion à trois parties, une protéine périplasmique à très haute affinité pour le composé à piéger (ici le molybdate), un transporteur logé dans la membrane cytoplasmique, et une ATPase du côté interne. Ce mécanisme est très répandu chez les bactéries et possède son équivalent chez les eucaryotes. Après capture du molybdate, celui-ci se voit donc transmis et concentré dans la cellule bactérienne avec l'aide d'une hydrolyse d'ATP comme source d'énergie [1]. Les cellules disposent d'une petite réserve de métal grâce à une protéine de stockage, qui a été détectée dans un Gram-positif (*Clostridium pasteurianum*) à l'aide de molybdate marqué **[6]**.

La fonction de Mo dans certaines enzymes d'oxydoréduction est maintenant assez bien connue. Une petite parenthèse peut être ouverte en citant la formiate déshydrogénase-H (FDH-H) *d'Escherichia coli*. Sa structure détaillée est connue. Le molybdène y est lié non seulement au cofacteur MGD décrit plus haut, mais au sélénium de la sélénocystéine, et le mécanisme de la catalyse est maintenant assez bien cerné **[7]**. La structure en dinucléotide du MGD ne se retrouve pas dans toutes les molybdoenzymes. Le cofacteur peut n'avoir que la partie molybdoptérine ou MPT, qui est dans le cadre grisé de la formule présentée plus haut. Si le molybdène est généralement indispensable à la réduction biologique du nitrate, on connaît tout de même de petites exceptions. À la fin de 1998, des auteurs russes ont fait état de la découverte d'un *Pseudomonas* (*Ps. isachenkovii*), dont la nitrate réductase était dépourvue de molybdène et du cofacteur correspondant **[8]**. L'enzyme était périplasmique et renfermait du vanadium. Une autre réductase était membranaire et ne possédait ni molybdène, ni vanadium. La question se pose donc de savoir s'il sagissait d'un cas exceptionnel, ou d'une situation plus commune qu'escompté,

---

1 - Au laboratoire, les cultures en milieu défini peuvent exiger l'introduction de faibles quantités de molybdate. mais les impuretés des produits commerciaux peuvent suffire, ainsi que l'acier inox des récipients.

qui aurait échappé aux investigations antérieures. La section suivante s'intéresse aux nitrate réductases bactériennes à Mo, pièces classiques de la dénitrification.

Les nitrate réductases "courantes" se répartissent grosso modo en trois plans structuraux. L'analyse des séquences montre qu'il y a de fortes homologies à l'intérieur de chacune des trois familles, dont la section suivante nous donnera les principaux caractères.

6.2 - NITRATE RÉDUCTASES VARIÉES

La multiplicité des nitrate réductases microbiennes a été résumée dans un tableau où apparaissent les sigles génétiques de base. Dans la première colonne, l'archétype de la nitrate réductase respiratoire et membranaire est le complexe **NarGHI** d'*Escherichia coli.* Ce système est réprimé par O_2. Il intervient dans la dénitrification. La colonne suivante cite la réductase **NapAB** logée dans le périplasme. Elle peut commander un mécanisme énergétique, donc une respiration de remplacement sur nitrate quand les conditions sont aérobies. Si NapAB peut effectivement se substituer à NarGHI en présence d'air, il s'agira d'une source énergétique d'appoint car la respiration sur O_2, plus efficace sur le plan thermodynamique, conservera le rôle prédominant.

Fonction	*Respiration sur nitrate* [9]	*Respiration ou contrôle redox* [10]	*Assimilation du nitrate* [11]
Localisation	Membrane	Périplasme	Cytoplasme
Structure sous-unités	$\alpha_2\beta_2\gamma_2 + \delta$	$\alpha\beta$ + cytochr. membr.	α
Sigle génétique	*narGHJI, narZYWV*	*napABC*	*nasA*
Cytochromes	Type b (NarI)	Type c (NapB)	(aucun)
Induction par nitrate	**oui**	**oui**	**oui**
Répression par NH_4^+	non	non	**oui**
Répression par O_2	**oui**	non	non
Transport nitrate exigé	**oui**	non	**oui**
M sous-unité catalytique	150 kDa (NarA)	90 kDa (NapA)	92 kDa

NarGHI du colibacille est l'archétype du complexe membranaire de la nitrate réductase respiratoire. Ce système est réprimé par O_2. Dans la colonne du milieu, la réductase NapAB située dans le périplasme peut donc commander une réduction du nitrate en aérobiose comme il a été dit. NasA est une réductase soluble à fonction assimilatrice qui ne participe pas à une récupération d'énergie. Les électrons prélevés sur nitrate par les réductases respiratoires sont captés par un ou plusieurs cytochromes. L'un d'eux est NarI qui fait partie intégrante du complexe NarGHI. Celui-ci est associé à la membrane et participe à la conservation d'énergie sous forme d'un potentiel Δp. Les électrons prélevés sur le nitrate par la réductase périplasmique NapAB parviennent aux chaînes de transport d'électrons de la membrane sur sa face externe avec conservation d'énergie. Toutes ces réductases ont un cofacteur à molybdène et sont des protéines fer-soufre. Lorsqu'elles réduisent le

nitrate sur la face cytoplasmique de la membrane (NarGHI) ou dans le cytoplasme lui-même (NasA), un mécanisme de transport des ions nitrite et nitrate est rendu nécessaire, car la membrane ne leur est pas directement perméable. La NarGHI de *E. coli* fonctionne grâce à un *antiporteur** : pour chaque nitrate qui rentre, il y a un nitrite qui sort. Cet antiporteur est codé par *narK* et inductible en même temps que la réductase **[12]**. Dans le cas de la réductase cytoplasmique assimilatrice existe un transporteur spécial observé dans *Klebsiella pneumoniae* et un *Synechococcus*.

La plupart des bactéries dénitrifiantes semblent avoir au moins deux réductases, voire trois, et il existe même plusieurs variétés dans chaque catégorie ! Les nitrate réductases respiratoires ont fait l'objet d'une attention particulière. À côté de la réductase membranaire du colibacille qui est la mieux connue et codée par l'opéron *narGHJI,* existe un deuxième complexe codé par l'opéron *narZYWV.* Celui-ci est fortement homologue du précédent et détermine une nitrate réductase dont les sous-unités sont interchangeables avec la première **[13]**. Cette situation est assez répandue dans les espèces dénitrifiantes, dont *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. stutzeri*, *Paracoccus denitrificans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus carnosus* et autres. Voici la composition du complexe NarGHJI du colibacille. Il possède sa chaîne d'oxydo-réduction interne avec NarH et NarI. La partie NarI contribue à ancrer solidement l'édifice moléculaire à la membrane : un chaperon moléculaire particulier pour la nitrate réductase et l'insertion du cofacteur à molybdène dans la partie NarG **[14]**.

Sous-unités	M(kDa)	Cofacteur associé	Fonction
NarG	138,7	MGD	Catalytique, réduit le nitrate
NarH	57,7	[3Fe-4S], 3 [4Fe-4S]	Transfère les électrons de NarJ à NarG
NarI	26,5	cytochrome b	Ancre membranaire, réduit par ménaquinol
NarJ	25,5	aucun	Stabilisateur, agit comme chaperon moléculaire

La sous-unité NarH a quatre centres fer-soufre numérotés de 1 à 4. Étudiés par RPE et potentiométrie, ils présentent une cascade de potentiels d'oxydoréduction différents, respectivement + 80, + 60, – 200 et – 400 mV. Le centre 2 est un [3Fe-4S]. Chose curieuse, l'activité réductase n'est pas supprimée si le centre 1, dont le potentiel est le plus élevé, est éliminé après mutation [2]. Les électrons sont probablement acheminés au sein du complexe par le canal de ces noyaux fer-soufre dont la chaîne n'a pas besoin d'être complète **[15]**. À cette chaîne fait suite le dispositif de NarI, qui est un cytochrome b comportant deux hèmes B **[16]** et possède deux potentiels différents, soit + 17 et + 122 mV. La structure du cytochrome deux fois héminique semble obéir à un schéma courant observé dans les complexes bc_1 comme celui qu'on trouve dans la mitochondrie. La nitrate réductase est donc un complexe macromoléculaire amenant les électrons à petits pas vers le nitrate, lequel est réduit sur la face cytoplasmique de la membrane. D'où viennent les éléments réducteurs ? Ils seraient fournis par un quinol respiratoire (quinone réduite) ou un ménaquinol.

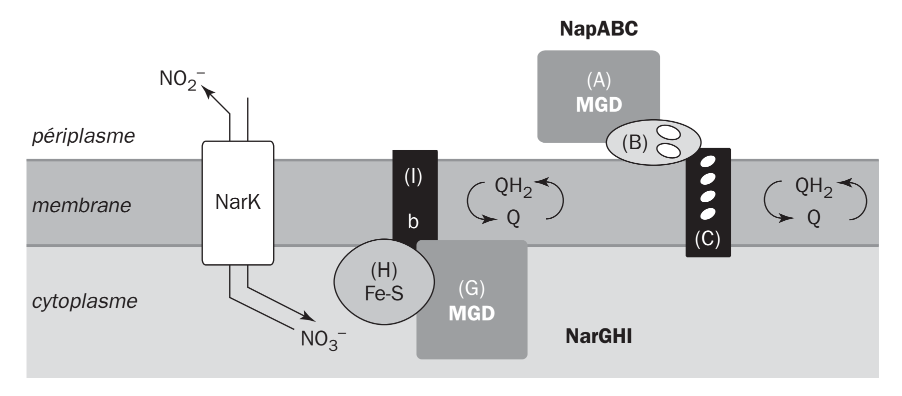
---

2 - Les centres fer-soufre sont liés ordinairement à la protéine par des résidus de cystéine (Cys). Une mutation remplace un Cys par la sérine ou l'alanine et empêche l'insertion correcte du cofacteur.

Contrairement à l'enzyme membranaire, la **nitrate réductase périplasmique** ne réduit pas le chlorate mais accepte une certaine aérobiose. Cette réductase ou NapABC est bâtie sur un plan assez différent du précédent d'après les études faites sur *Ralstonia eutropha* et l'espèce photosynthétique *Rhodobacter sphaeroides* **[10]** :

Sous-unités	*M(kDa)*	*Cofacteur associé*	*Fonction*
NapA	93,3	MGD, [4Fe-4S]	Catalytique, réduit le nitrate
NapB	18,9	Cytochrome c dihème	Transfère les électrons de NapC à NapA
NapC	27	Cytochrome c tétrahème	Réduit NapB, inséré dans la membrane
NapD, NapE	25,5	[4Fe-4S]	Incomplètement étudiés, fonct. mal connue

En aérobiose, l'enzyme respiratoire NarGHJI est hors course, car il y a répression de sa synthèse, mais la réductase périplasmique peut prendre le relais et aurait une double fonction. Elle dissiperait l'excès de pouvoir réducteur, notamment dans les espèces photosynthétiques comme *Rhodobacter* où il peut y avoir une sorte de "surchauffe" en éclairement fort. Elle peut aussi faire du nitrite dont la dénitrification peut se poursuivre en présence de O_2. La réductase périplasmique pourrait aussi faciliter la transition au fonctionnement anaérobie en cas d'épuisement soudain en oxygène, laissant le temps au cellules de refaire leur stock en NarGHJI. Un diagramme résume ce qui précède. Une quinone respiratoire et sa forme quinol sont désignées par Q et QH_2. Sont figurées la nitrate réductase respiratoire NarGHI et l'enzyme périplasmique NapABC. La protéine membranaire NarK est le transporteur.



Nitrate réductases

Les acteurs de la dénitrification ont donc une palette d'outils de base pour faire face à des besoins variés et fluctuants, mais il ne s'agit que du début du processus. Il nous reste à examiner rapidement les systèmes qui réduisent les nitrites, NO et N_2O. Une mine de trouvailles a permis de comprendre un peu mieux un cycle biochimique dont les répercussions sur l'agronomie et la défense de l'environnement sont à l'évidence essentielles.

6.3 - LA RÉDUCTION DES NITRITES

L'ion nitrite est le premier intermédiaire dans la réduction du nitrate. Il est réduit à son tour par une nitrite réductase dans une réaction énergétique :

$$NO_2^- + 2\,H^+ + e^- \longrightarrow NO^\bullet + H_2O \quad (\Delta G'° = -76{,}2\ kJ\,.\,mol^{-1})$$

Ce sont des protéines solubles. Un seul électron est mis en jeu pour aboutir à un radical, l'oxyde nitrique, dont la toxicité s'explique par les nombreuses réactions secondaires qu'il peut donner avec l'oxygène, le superoxyde, les métaux de transition, les amines, les thiols et la tyrosine. Il est considéré comme agent mutagène. L'oxyde nitrique est pourtant un produit biologique important. Il est engendré par la NO synthase répandue chez les eucaryotes, mais décelée aussi chez des bactéries du genre *Nocardia*. La synthèse de NO a lieu à partir de l'arginine, exerce un contrôle multidirectionnel, par exemple dans le métabolisme du fer, la pression artérielle, ou comme neurorégulateur. Une surproduction de NO est liée au processus inflammatoire. Malgré ces états de service, l'oxyde nitrique est bien un produit à risque dans la nature. Cette question vaut bien une petite parenthèse.

Parmi les entités les plus toxiques liées au métabolisme d'O_2 et de l'azote figurent le radical hydroxyle (OH) et l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$). Le premier est produit par la *réaction de FENTON**, le deuxième par réaction de $NO^\bullet$ sur le superoxyde. Le peroxynitrite réagit avec CO_2 pour donner des intermédiaires instables qui contribuent à son élimination en se décomposant à nouveau pour donner du nitrate et libérer à nouveau CO_2. La décomposition du peroxynitrite dans l'eau à pH 7 est rapide, avec une vie moyenne de l'ordre de la demi-seconde et le superoxyde est lui-même encore plus instable. Mais la réaction du peroxynitrite avec le superoxyde est beaucoup plus rapide et produit deux radicaux, hydroxyle ($OH^\bullet$) et dioxyde d'azote (NO_2). Leur apparition peut créer une situation dangereuse dont les cellules se protègent en accélérant la disparition du superoxyde par la superoxyde dismutase. Existe-t-il également une protection contre le peroxynitrite ? La réponse est affirmative d'après BRYK et coll **[17]**. L'intervention est due à une enzyme, l'alkylperoxyde réductase, observée dans diverses espèces bactériennes. L'enzyme AhpC est codée par l'opéron *ahpCF* de *Salmonella typhimurium*, conjointement avec une flavoprotéine (AhpF). Cet opéron est activé par la protéine régulatrice du stress oxydant OxyR* et intervient certainement dans la résistance à l'oxygène de nombreux micro-organismes, en particulier les formes micro-aérophiles. Conclusion : le monoxyde d'azote est bien un produit potentiellement dangereux pour la vie cellulaire.

Revenons à la **nitrite réductase** et à la dénitrification proprement dite. Il existe deux catégories d'enzymes complètement différentes, mais jamais présentes ensemble dans les mêmes cellules. Les premières sont des cytochromes à 4 hèmes, les cytochromes **cd_1**. Les secondes ou **CuNIR** sont des protéines contenant du cuivre. Le tableau en donne une comparaison sommaire :

	Cytochrome cd_1	*CuNIR*
Structure	Homodimère, environ 120 kDa	Homotrimère (α_3), 85-110 kDa
Localisation	Périplasmique	Périplasmique
Cofacteur	2 × (hèmes C et D_1)	2 Cu^{2+}, types 1 et 2 [3], par sous-unité
Donneur d'e^-	Azurine, pseudo-azurine, cyt. c_{551}	Azurine, pseudo-azurine, cyt. c_{552},
Distribution	Prédominent : bactéries du sol (*Pseudomonas*, *Ralstonia*...)	*Alcaligenes*, *Bacillus*, *Rhodobacter*, *Achromobacter*, *Nitrosomonas*...

La répartition des deux catégories dans l'environnement ne fait pas bon ménage avec la taxonomie. Par exemple il y a des *Pseudomonas* munis de la réductase à cuivre, d'autres avec le cytochrome. *Rhodobacter sphaeroides* a l'enzyme à cuivre, *Rhodobacter denitrificans* a le cytochrome. Il y a des variantes intéressantes. Par exemple une souche sulfato-réductrice appartenant à l'espèce *Desulfovibrio desulfuricans* possède une nitrite réductase à cytochrome dotée en même temps d'une forte activité comme sulfite réductase **[18]**. Pourquoi ces deux solutions concurrentes ? Nous n'en avons aucune idée, mais il est possible que la réaction à catalyser soit assez difficile pour appeler la sélection de systèmes très particuliers, éloignés des enzymes d'oxydoréduction les plus courantes. La question se pose notamment pour le cytochrome cd_1. En effet l'enzyme a deux hèmes distincts, C et D_1 ; le second lie O_2, CO, NO et NO_2^-, a une formule particulière, et nécessite à lui tout seul une voie de biosynthèse spéciale à partir de l'*uroporphyrinogène III*.*

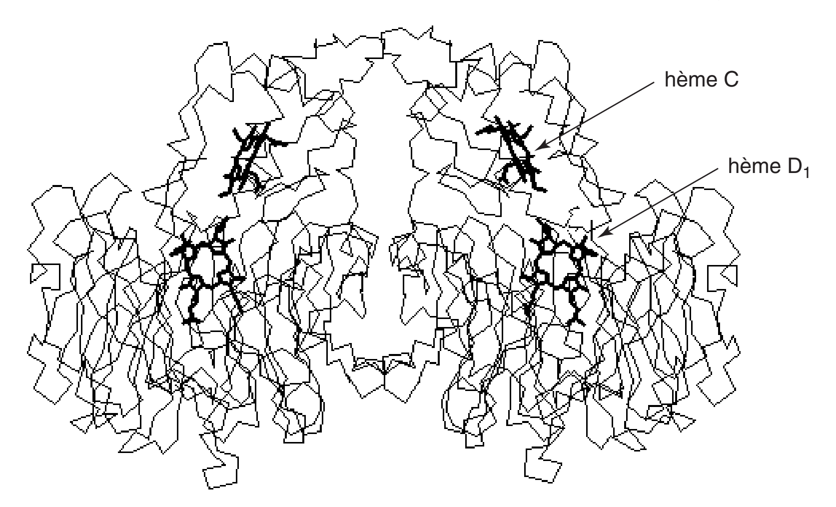
Hème C *Hème D_1*

Le **cytochrome cd_1** est une enzyme intéressante. Il a été découvert paradoxalement comme une cytochrome oxydase induite par le nitrate dans *Pseudomonas aerugnosa* **[19]**, car il utilise un cytochrome c comme donneur et peut accessoirement réduire O_2 en 2 molécules de H_2O avec transfert de 4 électrons comme

3 - Distinction expliquée dans le Glossaire, rubrique Cuivre.*

dans une chaîne respiratoire aérobie classique. Néanmoins la réactivité du cytochrome cd_1 pour le nitrite est au moins cent fois plus grande que pour l'oxygène. Son fonctionnement comme oxydase est un peu particulier. La réduction de O_2 se fait sur le fer de l'hème D_1 et non pas sur un centre bi-métallique Fe-Cu comme dans l'oxydase mitochondriale. Il s'agit peut-être d'une triple adaptation : la nitrite réductase cd_1 serait amenée à faciliter la dénitrification en présence d'un peu d'oxygène, contribuerait à éponger ce dernier quand il est présent au cours de la dénitrification, et servirait à détoxifier le nitrite au cours de l'aérobiose. La nitrite réductase cd_1 est un dimère symétrique, chaque sous-unité étant munie d'un hème C et d'un hème D_1, que la figure ci-après compare entre eux. Le premier, à gauche, a la structure classique de la molécule appelée protoporphyrine IX, présente dans l'hémoglobine, mais il est attaché à la protéine par des liens covalents sur cystéine (Cys). Le second, à droite, n'a pas de tels liens, et on devine que sa réalisation hors norme va nécessiter l'intervention dans la cellule bactérienne des enzymes spécialisées supplémentaires.

La structure du cytochrome cd_1 est connue grâce à l'analyse cristallographique faite à Oxford **[20]**. Les noyaux porphyriques sont superposés dans la nitrite réductase comme l'indique un schéma montrant les deux sous-unités identiques agencées symétriquement par rapport à un axe, et contenant au total 4 hèmes figurés en trait épaissi. Seule est représentée la charpente de chaque polypeptide ou chaîne primaire, à l'exclusion des chaînes latérales des acides aminés qui sont au nombre de 567. La réduction de chaque molécule de NO s'accompagne, d'après l'analyse structurale, d'un va-et-vient entre deux conformations légèrement différentes, comme si le dimère palpitait dans son ensemble au cours de la catalyse.



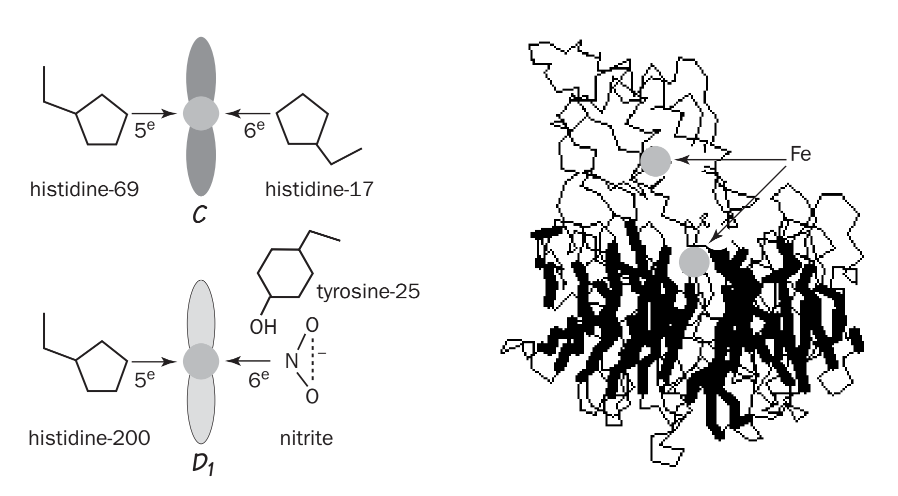
Structure du cytochrome cd_1

Les électrons venant un à un d'un donneur extérieur passeraient par l'hème C. Un cheminement interne à la protéine ferait alors parvenir chaque électron à l'hème D_1 qui est assez proche et constitue le pôle réactif sur lequel le nitrite ou l'oxygène sont réduits. Le cheminement serait donc :

Donneur (*azurine**) $\rightarrow$ surface de la protéine $\rightarrow$ hème C $\rightarrow$ chaîne interne $\rightarrow$ hème D_1

Chacune des deux sous-unités est donc structurée pour faire marcher par elle-même la réaction. Elle comporte deux "domaines", celui de l'hème C en haut sur le croquis, et celui de l'hème D_1. Ce dernier est logé dans une portion assez rigide, consolidée par des *barreaux bêta** : la chaîne forme autour du D_1 une sorte de couronne de pétales orientés un peu comme les pales d'une turbine. Le D_1 est rendu accessible au substrat (le nitrite) par une ouverture disposée dans la partie inférieure telle que la molécule est orientée sur le dessin.

Un autre croquis explicatif montre les traits suivants. À droite est représentée une sous-unité isolée, la présence du fer étant repérée par les boules grises, et la portion charpentée par des barreaux bêta en trait épaissi. À gauche est indiqué l'environnement du fer dans chaque hème. La cinquième coordinence est occupée par de l'histidine (avec numéro dans la séquence), la sixième par l'histidine dans l'hème C. En ce qui concerne l'hème D_1 du site actif, la sixième coordinence est vide (ou faiblement occupée par une molécule d'eau retenue par deux histidines, non représentées). C'est là que viendra s'installer l'ion nitrite, ou le cas échéant une molécule de O_2. La tyrosine-25 (Tyr-25) pourrait bien prendre la place, mais elle est facilement tirée en arrière par le reste de la chaîne. Un petit détail important comme nous allons le voir.



Le dessin suivant montre l'une des communications entre les deux hèmes. Le premier est attaché à la protéine par deux cystéines. On observera la position de l'histidine-17 en sixième coordinence. La communication s'établit ici par le segment His-17 → Tyr-25 de la séquence. La lettre N désigne la position du nitrite.

Quel est le principe de ce mécanisme ?

Rappelons la réaction : $NO_2^- + 2\ H^+ + e^- \longrightarrow NO + H_2O$. Il faut donc 2 protons et 1 électron. On pense que les deux protons sont injectés à partir de His-345 et His-388 situés à proximité de l'hème D_1 et sont compensés à partir du reste de la protéine et par l'extérieur. Chaque électron arrive par le canal de l'hème C jusqu'à l'hème D_1, suivant un cheminement qui emprunte la chaîne polypeptidique le long du segment His-17-Tyr-25.

a - sans les porphyrines *b - avec les hèmes en place*

L'environnement des hèmes

Voilà le principe essentiel qui semble se profiler. La tyrosine-25 s'intéresse beaucoup au fer, mais la réduction du D_1 provoque un petit changement de conformation de la protéine qui la tire en arrière, dégageant du même coup la sixième position sur le fer. C'est là que le nitrite vient s'installer librement. La spectroscopie RPE suggère que son azote établit la sixième coordinence et rétablit ainsi la symétrie autour du métal. Les opérations peuvent se résumer ainsi (en noir l'hème D_1 oxydé, en blanc l'hème réduit) :

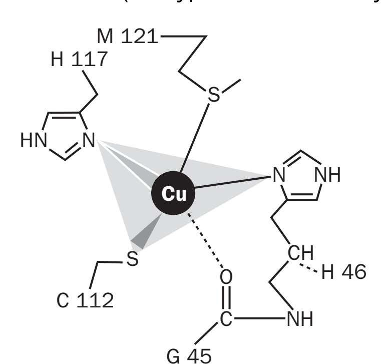
$$\blacksquare D_1 \xrightarrow{e^-} \square D_1 \xrightarrow{\text{nitrite}} \square D_1-NO_2^- \xrightarrow[H_2O]{2\,H^+} \square D_1-NO^+ \longrightarrow \blacksquare D_1-NO \xrightarrow{NO} \blacksquare D_1$$

Il s'est formé une combinaison réactive : D_1-Fe^{2+}-NO^+ . Le fer s'efforce de céder un électron, tandis que son ligand chargé positivement ne demande qu'à en récupérer un. Le passage de l'un à l'autre conduit à D_1-Fe^{3+}-NO, où le produit de la réduction de l'ion nitrite est NO qui reste lié au fer. L'association de NO à l'hème est extrêmement forte si le fer est réduit. À défaut de l'oxydation du fer, l'oxyde nitrique devrait rester bloqué en permanence sur sa position. Le passage du fer à l'état Fe^{3+} et la présence de la tyrosine-25 corrigent cet inconvénient. La tyrosine s'était écartée, mais à la faveur du changement de conformation inverse du premier, elle revient sur le fer et contribue à chasser NO. Ce dispositif spécial utilise donc une porphyrine modifiée et un changement de conformation dans une molécule très complexe, pour en fin de compte pouvoir chasser l'oxyde nitreux ! Le changement de conformation est l'étape la plus lente de la réaction (0,1 à 0,5 s^{-1}), mais n'empêche pas l'enzyme de rester très efficace dans la réduction de l'ion nitrite ! Ce phénomène intéressant a été passé au peigne fin grâce à l'analyse structurale à

haute résolution. Les cristaux se laissent assez facilement réduire [4], et on peut même y faire diffuser le substrat.

On sait maintenant que le cycle catalytique met en jeu un changement conformationnel global, qui modifie la distribution des liaisons hydrogène internes et implique Tyr-25. En outre la réduction de l'hème C perturbe l'environnement du fer et remplace His-17 par un résidu voisin (Met-106) **[21]**. De tels résultats sont extrêmement importants sur un plan général pour comprendre le fonctionnement des transferts d'électrons intramoléculaires et c'est pourquoi nous nous y sommes attardés ici. L'enzyme est un outil performant sélectionné en vue d'éliminer le plus vite possible le nitrite et NO, dont l'accumulation dans l'environnement aurait des effets délétères sur la microflore ! L'existence intermédiaire d'une entité très réactive indiquée précédemment est certainement responsable des réactions secondaires de la nitrite réductase observées sur les amines, l'azoture (ou "azide") et l'hydroxylamine. Ces réactions sont des nitrosations. Elles conduisent à des produits très toxiques, en particulier les nitrosamines. C'est peut-être l'inconvénient majeur du nitrite qui peut se comporter comme un cancérigène.

La **nitrite réductase contenant du cuivre** est complètement différente de la précédente, n'ayant aucune homologie avec elle bien que la réaction catalysée soit la même. Rappelons-nous. Au sein de la nitrite réductase les électrons provenant d'un donneur (du type azurine ou cytochrome c) étaient canalisés jusqu'au substrat par deux hèmes successifs. Une autre solution consiste à remplacer les hèmes par 2 ions cuivre dans une téine d'architecture différente mais fonctionnant de manière comparable.



Le cuivre dans l'azurine

La présence du métal confère à ces enzymes une couleur assez intense, bleue (595 nm) ou verte (plusieurs bandes vers 460, 590, 700 et 850 nm) et des signaux caractéristiques en RPE. Les deux ions Cu^{2+} (I) et (II) ont une géométrie de coordination différente dans les deux cas.

Le *cuivre de type I* est coordonné par 4 résidus d'acide aminé (2 His, Met, Cys) et confère à la protéine sa couleur bleue ou verte. Le dessin montre ce type de coordination dans l'azurine de *Pseudomonas aeruginosa*, qui échange un électron avec le cytochrome c_{551} **[22]**. Trois liaisons avec histidine et cystéine définissent un plan, les deux autres avec méthionine et un carbonyle étant au-dessus et au-dessous.

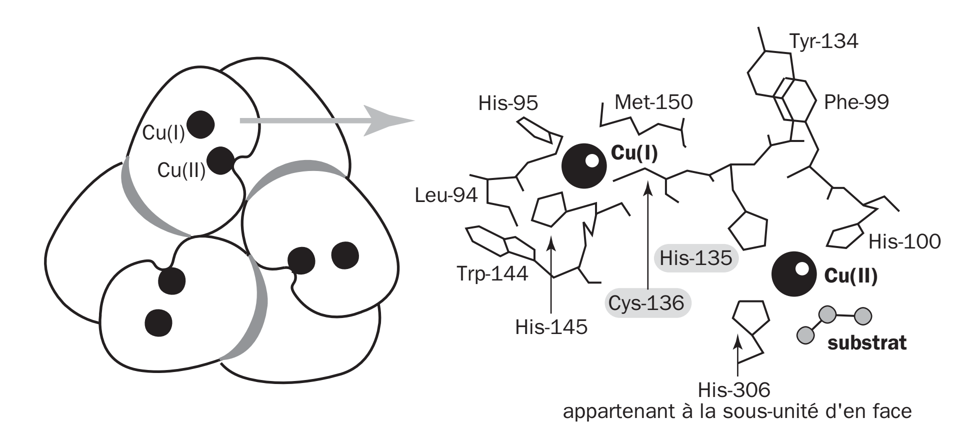
4 - On ne peut pas faire cette réduction par le donneur d'électrons naturel, qui n'entrerait pas dans le cristal. On utilise un réducteur artificiel, dithionite ou viologène réduit. Le cristal passe du brun au vert par réduction.

Cette structure subit une légère déformation au cours de l'oxydoréduction et la petite protéine réagit de façon dynamique par un changement de structure au cours du transfert.

Le *cuivre de type II* est lié à trois résidus seulement (3 His), la quatrième coordination étant occupée par une molécule d'eau que le substrat vient bousculer. Les deux ions Cu oscillent entre les états Cu^{+} et Cu^{2+}, les électrons cheminent dans le sens Type I → Type II par un transfert intramoléculaire **[23]**. Il existe une analogie du fonctionnement avec celui du cytochrome cd_1 **[24]** :

$$Cu^{2+} \xrightarrow{e^-} Cu^{+} \xrightarrow{\text{nitrite}} Cu^{+}\!-\!NO_2^- \xrightarrow[-H_2O]{2\,H^+} Cu^{+}\!-\!NO^{+} \longrightarrow Cu^{2+}\!-\!NO \xrightarrow{-NO} Cu^{2+}$$

La structure détaillée de la nitrite réductase d'*Achromobacter cycloclastes* est connue **[25]**. L'enzyme est un trimère de trois polypeptides identiques de 340 résidus chacun. Chaque sous-unité est articulée en deux domaines, dont l'un porte les deux ions Cu essentiels. Un dessin tente de résumer cette disposition. La coordinence du cuivre de type I avec la cystéine, et la géométrie tétraédrique plus ou moins déformée autour du métal a des effets sur le spectre d'absorption et détermine la couleur bleue ou verte de l'enzyme.



Nitrite réductase d'Achromobacter cycloclastes

La partie droite permet de constater trois éléments intéressants. Tout d'abord le cuivre de type I fait une coordinence avec l'atome de soufre de la cystéine-136, qui jouxte l'histidine-135 dans la séquence. Or ce dernier est lié également au cuivre de type II. Il y a donc un court cordon de communication entre les deux ions cuivre renforcé par l'empilement des cycles de la tyrosine-134 et de la phénylalanine-99. On voit ensuite que la sphère de coordination du cuivre de type II est incomplète. Une case vacante est occupée par une molécule d'eau avec une interaction faible en position d'attente. Elle est facilement remplaçable par le substrat. C'est donc le pôle réactionnel de la protéine et il est supposé actuellement que l'ion nitrite

interagit avec le cuivre par l'un de ses atomes d'oxygène **[26]**. Le troisième point à considérer est la coordination du cuivre de type II par l'histidine-306 appartenant à la sous-unité voisine. Le site catalytique est donc construit dans la surface de contact entre les deux parties symétriques du dimère.

Toutes les nitrite réductases contenant du cuivre seraient bâties sur ce modèle sauf différences de détail, et des éléments de séquence sont fortement conservés. Voici la ressemblance d'une portion de séquence entre trois espèces au niveau de plusieurs résidus coordonnant le Cu de type I (1) et le Cu de type II (2). Les trois espèces bactériennes sont *Pseudomonas aureofaciens* (*P.a*), *Achromobacter cycloclastes* (*A.c*) et *Alcaligenes faecalis* (*A.f*). On repère facilement, par exemple, la succession YHC. L'histidine-306, non montrée sur ce segment, est également conservée.

```
           1     2                                               2 1        1      1
P.a  NSMP |H|NVDF|H|AATGALGG AGLTQVVPGQEVVL RFKA DRSGT FVY|HC|AP QGMVPW|H|VVSG|M|NGALMV
A.c  NTLL |H|NIDF|H|AATGALGG GALTQVNPGEETTL RFKA TKPGV FVY|HC|AP EGMVPW|H|VTSG|M|NGAIMV
A.f  NTLM |H|NIDF|H|AATGALGG GGLTEINPGEKTIL RFKA TKPGV FVY|HC|AP QGMVPW|H|VVSG|M|NGAIMV
```

Ces réductases sont-elles spécifiques du nitrite ? Il y a de petites différences parmi la douzaine de cas de figures examinés dans la littérature. Souvent quelques pour cent de N_2O sont produits en plus du NO. Parfois apparaissent un peu d'hydroxylamine et d'ammoniac, mais ces réactions n'ont peut-être pas d'importance physiologique **[27]**. Il arrive enfin que O_2 soit réduit comme dans le cas du cytochrome cd_1.

Les donneurs d'électrons partenaires des nitrite réductases sont des protéines, soit des cytochromes c, soit des cuprédoxines, c'est-à-dire des protéines d'oxydoréduction contenant du cuivre. Parmi ces dernières, l'azurine et la pseudo azurine [5]. Ce sont les donneurs préférés des réductases à cuivre, mais la réductase de *Rhodobacter sphaeroides* utilise plutôt un cytochrome c_2. L'azurine et la pseudo-azurine ont une faible masse moléculaire, un seul ion Cu, et ont des structures très comparables. Le cuivre de l'azurine est entouré par Cys, Met et deux His comme le Cu de type I de la réductase. L'azurine travaille surtout avec les réductases bleues, la pseudo-azurine avec les vertes. Pourquoi cette sélectivité ? Probablement pour une question de complémentarité de surface. Pour que deux protéines entrent en échange d'oxydoréduction, il faut qu'elles s'accolent d'une certaine façon, et leur adhérence est ici facilitée par la distribution des charges ioniques de leur périphérie. Autrement dit, la sélectivité serait en grande partie une question de complémentarité ionique **[28]**. Quelle est la source d'électrons en amont de la cuprédoxine ? La chaîne respiratoire bactérienne joue ce rôle, et utilise ici la nitrite réductase comme exutoire. La réduction du nitrite en NO au cours de la dénitrification ne participe pas directement à la production d'énergie. C'est tout

---

5 - *La palette des petites protéines dépourvues d'activité enzymatique et servant de transporteurs d'électrons dans la nature contient des éléments variés: cuprédoxines (contenant du cuivre), des ferrédoxines (avec noyau fer-soufre), rubrédoxines (du fer, mais pas de soufre acido-labile), thiorédoxines (avec deux thiols adjacents), flavodoxines (avec FMN), cytochromes de type c, et on en passe.*

simplement la chaîne des transporteurs respiratoires dans la membrane qui assume cette fonction. Les nitrite réductases sont donc des enzymes intéressantes sur le plan fondamental et en même temps fort essentielles dans l'environnement. On s'attend à les trouver dans de nombreuses espèces du sol. Par exemple des actinomycètes sont capables de transformer le nitrate en nitrite et N_2O, et on a mis en évidence récemment chez *Streptomyces thioluteus* une nitrite réductase à cuivre, fonctionnant avec une azurine comme donneur **[29]**.

6.4 - LE PASSAGE DIRECT DU NITRITE À L'AMMONIUM

La réduction de l'ion nitrite peut se faire dans deux directions, soit vers la formation d'oxyde nitrique qui a retenu l'attention de la section précédente, soit par conversion directe en NH_4^+. La première fait partie de la dénitrification, la seconde fait partie de la voie appelée ammonification :

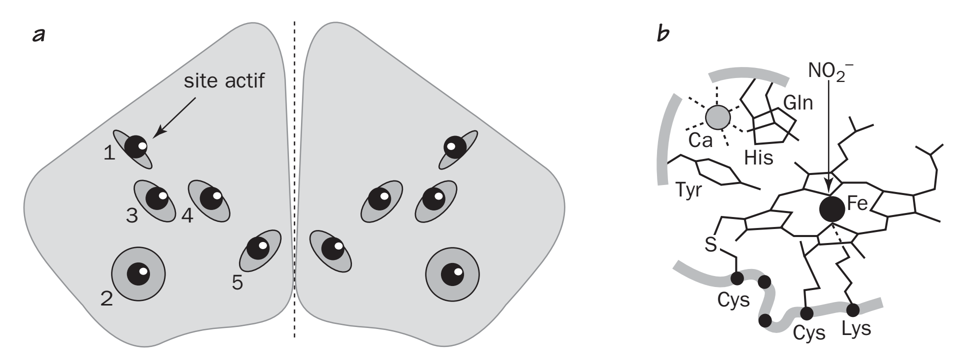
$$NO_2^- + 6\,e^- + 8\,H^+ \longrightarrow NH_4^+ + 2\,H_2O$$

Rappelons les faits. Cette conversion à 6 électrons peut donner lieu à une récupération d'énergie par la cellule (dissimilation) ou à la fabrication parallèle de l'azote ammoniacal nécessaire à la synthèse des produits azotés (assimilation). Le potentiel correspondant au couple NO_2^-/NH_4^+ est E'° = + 340 mV. Il n'est pas très différent de celui du couple NO_2^-/NO (E'° = +350 mV), mais cette conversion est catalysée par une réductase distincte des nitrite réductases entrevues dans la section précédente. Les végétaux chlorophylliens, qui bénéficient à la lumière d'une énergie bon marché, se contentent de faire l'assimilation du nitrate pour en tirer l'ammonium nécessaire à leurs synthèses et utilisent une stratégie particulière que nous n'aborderons pas ici. Un récapitulatif très succinct concernant le monde végétal est donné en glossaire (voir *Assimilation du nitrate**).

Il ne sera question maintenant que des **cytochrome c nitrite réductases** dissimilatrices conduisant à l'ammoniac. Elles forment une troisième famille d'enzymes réduisant le nitrite, différentes de celles que nous connaissons déjà par la section précédente et sans homologie avec elles. Ces nouvelles réductases sont héminiques. Le colibacille fait une enzyme de ce type en anaérobiose et réduit le nitrite en utilisant le formiate comme donneur d'électrons. Elle est désignée par **NrfA** et contient une ribambelle de noyaux héminiques de type C (soit 5 au total par sous unité) **[30]**. L'insertion des hèmes est facilement repérable dans la séquence par le motif caractéristique Cys-x-x-Cys-His qui marque la position des liens covalents entre hème et protéine. Ces liaisons sont sur cystéine, et l'histidine est l'un des ligands du fer, ce dispositif étant caractéristique des cytochromes c. L'un des hèmes fait exception, car il est lié par un motif Cys-x-x-Cys-Lys. Ces enzymes multihéminiques participant à la dissimilation de l'ion nitrite sont attachés à la membrane et reçoivent apparemment leurs électrons d'un autre cytochrome c. Leur caractérisation détaillée a déjà été faite dans plusieurs espèces : *Desulfovibrio desulfuricans* **[31]**, *Wolinella succinogenes* **[32]** et *Sulfurospirillum deleyianum*, avec dans ce cas la structure détaillée **[33]**. La nitrite réductase du *S. deleyianum* est un

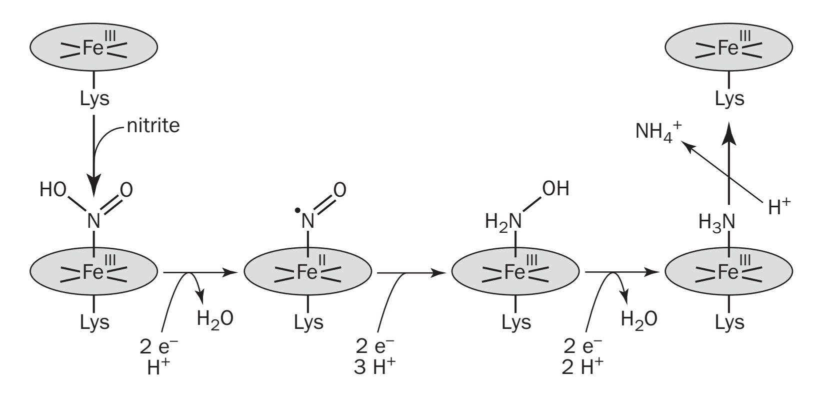
dimère contenant au total dix galettes héminiques de type C placées au voisinage les unes des autres. Dans chaque sous-unité, l'hème dont le fer est lié à la lysine au lieu de l'histidine est lié aussi à un ion sulfate et c'est à son niveau que se fait la catalyse. Ce modèle structural fondé sur chaîne d'hèmes C n'a rien d'exceptionnel dans la nature et répond à des adaptations intéressantes. Par exemple la nitrite réductase de *Desulfovibrio desulfuricans* a aussi une chaîne d'hèmes et réduit également le sulfite **[34]**. Cette réductase a une activité si forte sur le nitrite (1,05 millimole de NO_2^- réduit par minute et par mg à pH 7) qu'elle a permis la conception d'un biocapteur **[35]**.

L'arrangement des hèmes C dans la cytochrome c nitrite réductase de *Sulfurospirillum deleyianum* est symbolisé en ***a*** sur le dessin. Le site actif est l'hème n°1, symbolisé en ***b***.



Cytochrome c nitrite réductase

Les trois réductions successives s'effectueront à ce niveau comme indiqué sur un schéma. L'oxyde nitreux et l'hydroxylamine ($H_2N–OH$) sont des intermédiaires qui ne quittent pas l'enzyme. Au niveau de chaque hème C attaché par liens covalents sur son consensus Cys-x-x-Cys-His, la liaison histidine-fer est perpendiculaire au plan de la porphyrine. Le résidu d'histidine contracte une liaison de coordination sur le fer perpendiculairement à la porphyrine.



Mécanisme de la réduction du nitrite

La lysine remplace l'histidine sur l'hème du site actif, et le sulfate (non figuré) est lié par un atome d'oxygène en sixième coordinence de l'autre côté du fer. Le substrat déplace le sulfate en s'installant à sa place. Le site actif s'entoure de glutamine, histidine, tyrosine et quelques molécules d'eau. En outre au voisinage immédiat se trouve un ion calcium. L'existence de l'hydroxylamine est hypothétique mais considérée comme très probable, car l'enzyme réduit aussi NO et l'hydroxylamine si on lui offre ces dérivés comme substrats. D'autre part elle présente des analogies très nettes avec une hydroxylamine oxydoréductase décrite chez *Nitrosomonas europaea*, bactérie du sol bien connue pour effectuer la réaction inverse de l'oxydation de l'ammoniac en nitrite **[36]**. Chose intéressante, l'analyse structurale a montré que l'ion nitrite accède au site par une ouverture comportant des charges positives, et que l'ammonium repart en direction opposée par un tunnel chargé négativement. Cette disposition facilite un courant unidirectionnel de l'élément azoté en jouant sur la différence de charge entre le substrat et le produit de la réaction. Ce courant à sens unique à travers la protéine expliquerait la très grande efficacité catalytique de l'enzyme. Quant aux autres hèmes C présents, ils servent certainement à acheminer des électrons vers le site actif. Les porphyrines et leurs groupes latéraux propioniques sont très proches les uns des autres et formeraient une sorte de fil conducteur. Ce dispositif moléculaire perfectionné contribue sans doute aussi à la rapidité d'action de l'enzyme.

6.5 - DE L'OXYDE NITRIQUE À L'OXYDE NITREUX

Nous étions passés du nitrite à l'ammoniac. Cette section fait retour à la dénitrification, dont le stade ultime n'est pas NH_3 mais N_2. Elle devrait nous apporter quelques nouvelles surprises. Une dénitrification n'est pas toujours complète et s'arrête parfois au stade N_2O chez diverses espèces bactériennes qui sont dépourvues de N_2O réductase. Cette situation existe notamment chez la plupart des carboxydotrophes **[37]**. En revanche certaines espèces peuvent effectuer une **respiration sur N_2O** sans pour autant utiliser le nitrate à cet effet : *Wolinella succinogenes*. Ce germe peut croître sur N_2O et le réduit en N_2 sans bénéficier d'une NO réductase, en conséquence de quoi il ne produit pas de N_2 à partir de nitrate. Celui-ci est réduit en nitrite puis en ammoniac pendant l'oxydation du formiate comme principale source carbonée **[38]**. Il peut donc y avoir une respiration sur N_2O qui fournit l'énergie pour faire marcher tout le reste, y compris l'utilisation de nitrate comme source d'ammoniac.

Le tableau résume quelques éléments sur les enzymes concernées. Ce sont des critères moyens, les résultats étant souvent discordants et parcellaires d'une espèce à l'autre.

Après la découverte des bases de la dénitrification, il a fallu quelques années avant que NO apparaisse comme un véritable intermédiaire. Il est difficile à mesurer et se prête mal à la croissance des bactéries dénitrifiantes. En outre sa nature radicalaire est à l'origine de réactions parasites.

	NO réductase **[39]**	*N_2O réductase* **[40]**
Réaction	$2 NO + 2e^- + 2 H^+ \rightarrow N_2O + H_2O$	$N_2O + 2e^- + 2 H^+ \rightarrow N_2 + H_2O$
Localisation	Membranaire	Périplasmique
Structure	$\alpha\beta$? (NorB, NorC)	α_2 (NosZ)
Masse moléculaire	170-180 kDa	≈ 120 kDa
Cofacteurs	Hèmes B, C + Fe (rapports 2:1:1) **[41]**	4 Cu par sous-unité
Donneur d'e^-	Cyt. c, PMS, TMPD, ascorbate	Cytochrome c
Inhibiteurs		Acétylène, cyanure, azoture, Zn^{2+}

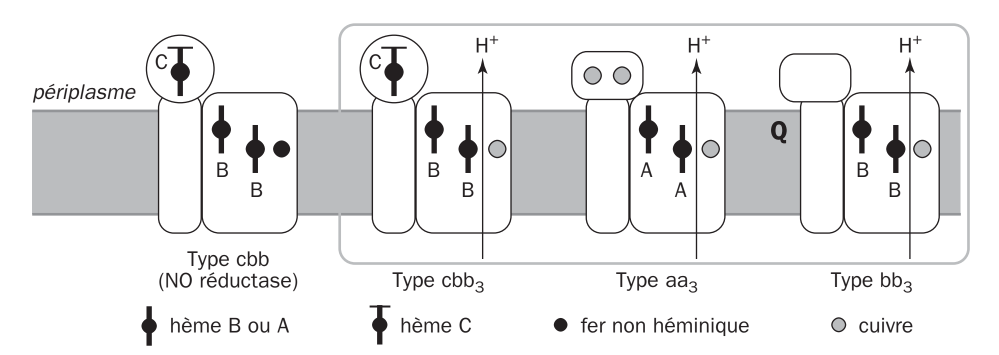
L'oxyde nitrique est produit dans le périplasme et capté sur place par la **NO réductase**. Bien que très diffusible, il n'a pas le temps d'atteindre un niveau nocif dans le cytoplasme cellulaire. Qu'on juge aussi de l'importance chimique de cette réaction : avec la nitrogénase, elle est la seule à établir la liaison très stable entre deux atomes d'azote. Elle est donc énergétique et la conversion de NO en N_2O a un potentiel élevé (E'° = + 1177 mV), comme d'ailleurs celle de N_2O en N_2 (+ 1352 mV). L'énergie libre standard mise en jeu est respectivement – 306 et – 399 kJ . mol^{-1}, plus importante que celle de la conversion du nitrate en nitrite. Il y a donc matière à une vigoureuse production d'énergie par la cellule bactérienne, contrairement à la réaction de la nitrogénase qui est consommatrice [6].

La NO réductase a deux atouts : elle est membranaire et possède des cytochromes b et c, qu'on a l'habitude de rencontrer comme intervenants dans les chaînes respiratoires. L'exemple le plus célèbre est le complexe bc_1 de la membrane interne mitochondriale, connu comme site de conservation d'énergie parce que la translocation de protons couplée au passage des électrons contribue à bâtir le potentiel de membrane. En est-il de même pour la NO réductase ? On pense actuellement que l'enzyme n'a pas ce pouvoir. Elle reçoit ses éléments réducteurs d'une chaîne respiratoire qui renferme le complexe bc_1, qui serait le véritable site de conservation d'énergie. L'étude de ce complexe dans *Pseudomonas stutzeri* montre qu'il collecte des électrons provenant de plusieurs voies dont celle de la NO réductase. Une autre voie part du NADH, utilise le canal de la NADH déshydrogénase membranaire et une quinone. C'est donc la fonction du bc_1 de produire de l'énergie et d'envoyer les électrons vers NO qui est un accepteur terminal.

Les connaissances sur la NO réductase restent fragmentaires, mais un aspect intéressant mérite d'être signalé. La réaction catalysée ressemble à celle d'une cytochrome c oxydase, soit $O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2 H_2O$. Or il existe une ressemblance de séquence entre la chaîne **NorB** de la NO réductase et la sous-unité I de la cytochrome c oxydase de *Paracoccus denitrificans*. La ressemblance est assez forte pour indiquer une structure similaire **[42]**. Rappelons que la structure minimale d'une cytochrome c oxydase comporte des sous-unités I, II et III dont la nature a été conservée au cours de l'évolution (y compris dans les mitochondries). La sous-unité I de l'oxydase aa_3 est la plus grosse et opère la réduction du dioxygène.

6 - Les valeurs sont précisées à l'état standard qui est très éloigné des conditions réelles. La concentration de NO en régime stationnaire est faible, et l'énergie mise en jeu à cette étape devrait être inférieure.

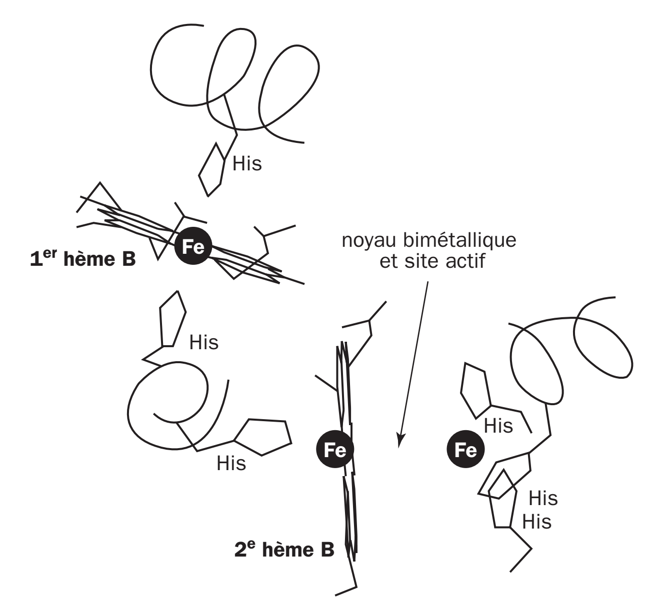
Ses éléments essentiels sont un hème A et un centre bi-métallique (un second hème A_3 et du cuivre). NorB offre une disposition comparable. La partie renfermant l'hème C (NorC) réduit un premier hème B, qui réduit à son tour la partie bi-métallique formée par le deuxième hème B et le fer non héminique. Voici un dessin imité de VAN DER OOST et coll. **[43]** :



NO réductase et oxydases terminales

La NO réductase, à gauche, du type cbb, est comparée aux trois oxydases élaborées par *Paracoccus denitrificans*, considérées comme des translocateurs de protons et figurées dans un cadre **[44]**. Les trois sous-unités NorB, NorC et NorE sont les parties fondamentales de la NO réductase imitant la structure de base de la cytochrome c oxydase mitochondriale. Elles sont homologues respectivement des sous-unités I, II et III de l'oxydase. Le type aa_3 représenté ici est celui de la principale oxydase de *Paracoccus* à ses heures aérobies. L'oxydase cbb_3 intervient en oxygène limitant et la bb_3 est une quinol oxydase. La NO réductase cbb est une quatrième machinerie produite au cours de la dénitrification. Les deux hèmes B de la sous-unité principale (NorB) dans cette enzyme sont assez proches l'un de l'autre en établissant une communication intramoléculaire. Le premier hème reçoit du cytochrome c (NorC) l'unique électron nécessaire à la réaction, et le deuxième hème établit le noyau bi-métallique avec le fer non héminique. Le passage des électrons dans cet ordre est considéré comme probable par comparaison avec les cytochrome oxydases. Dans le premier hème, le fer est hexacoordonné, sa géométrie est complète et lui donne la propriété bas spin, au contraire du deuxième qui est un fer *haut spin**. Les coordinations sont établies par des résidus d'histidine. Un court segment faisant partie d'une hélice relie les deux premiers atomes de fer. C'est peut-être le "fil électrique" qui relie les deux, ainsi qu'un fil de traction comme dans le cd_1.

Le mécanisme exact de la soudure entre atomes d'azote reste problématique. Une hypothèse considère l'installation de deux molécules de NO côte à côte entre les deux ions fer du site bi-métallique avant formation de la liaison N=N. L'une de ces molécules est retenue par l'hème réduit, avec une affinité extrêmement forte qui a probablement pour effet d'empêcher toute "fuite" prématurée. La deuxième molécule appelée par le fer non héminique établirait la combinaison transitoire O–N=N–O que postulent certains auteurs **[45]**. L'un des atomes d'oxygène serait alors emporté dans une molécule d'eau.



Les sites métalliques de NorB

Le plus extraordinaire est que la NO réductase n'a pas l'exclusivité de cette réaction. D'autres protéines sont capables de former un peu de N_2O : la ribonucléotide réductase aérobie, l'hémocyanine et même la cytochrome c oxydase **[46]**, trois systèmes qui bénificient d'un noyau bi-métallique, respectivement Fe-Fe, Cu-Cu et Fe-Cu. Inversement on connaît la NO réductase cbb de *Paracoccus denitrificans* qui est capable de réduire O_2 **[47]**.

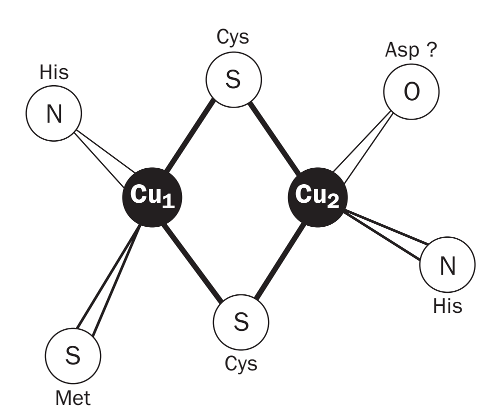
Cette question amène inévitablement des spéculations sur l'histoire de la vie. On considère généralement que la montée de l'oxygène dans l'atmosphère terrestre a été le résultat de la photosynthèse oxygénique, qui est liée à la dissociation de l'eau. Les premiers ancêtres des cyanobactéries actuelles auraient provoqué une lente révolution planétaire dans la biochimie des organismes. Il a fallu s'adapter à un potentiel d'oxydoréduction plus élevé, résister aux effets nocifs d'O_2, ou même l'utiliser. D'après certains auteurs tels que CASTRESANA, LUBBEN ET SARRASTE **[48]**, le monde vivant aurait pu conserver un modèle unique d'enzyme respiratoire utilisant NO ou l'oxygène. La NO réductase aurait précédé l'apparition des cytochrome oxydases, puis des quinol oxydases. Elle pourrait correspondre à une dénitrification primitive antérieure à la photosynthèse oxygénique. Les premières oxydases seraient apparues ensuite, antérieurement à la séparation des eubactéries et des archaebactéries. L'atmosphère terrestre primitive contenait sans doute de petites quantités d'oxygène et d'oxyde nitrique formés par des réactions photochimiques sur l'eau de la surface des océans et sur l'azote moléculaire. La montée d'O_2 aurait exigé une adaptation et une diversification des outils déjà disponibles. L'acquisition d'une translocation de protons et de nouvelles régulations aurait fait partie des nouvelles avancées. La dénitrification est-elle la respiration la plus archaïque ? Il y a beaucoup plus de suppositions que de certitudes dans ce domaine, qui offre néanmoins un terrain de réflexion fascinant.

6.6 - DE N_2O AU DIAZOTE

Diverses espèces bactériennes ne franchissent pas le stade N_2O au cours de la dénitrification et libèrent celui-ci dans l'atmosphère. Au contraire d'autres agents de dénitrification peuvent se développer sur N_2O comme seul accepteur respiratoire au cours de la dégradation de composés organiques tels que le benzène et des alkylbenzènes **[49]**. Bien que l'**oxyde nitreux réductase** (NosZ) soit une enzyme périplasmique soluble, elle participerait à une conservation d'énergie **[50]**.

Le bouclage du grand cycle de l'azote planétaire se fait avec le concours du cuivre. Nous avons déjà rencontré ce métal plusieurs fois et nous le retrouvons dans la N_2O réductase. Celle-ci catalyse la conversion $N_2O + 2\ e^- + 2\ H^+ \longrightarrow N_2 + H_2O$, qui a un potentiel E'° de + 1350 mV, soit une variation d'énergie libre de – 339 kJ . mol^{-1}. L'oxyde nitreux est donc un excellent oxydant potentiel quand il se débarrasse de son atome d'oxygène. L'opération a pourtant besoin d'un activateur qui est en général un métal de transition. Sans cette activation, N_2O est aussi inerte dans les conditions physiologiques que l'est N_2 lui-même. Aussi la vie moyenne d'une molécule d'oxyde nitreux dans l'atmosphère, estimée à 150 ans environ, fait de ce gaz un des acteurs de l'effet de serre. Un métal de transition noté M^n facilite la scission de N_2O par : $M^n + N_2O + 2\ H^+ \longrightarrow N_2 + H_2O + M^{n+2}$. La N_2O réductase a donc recours à un métal qui est encore le cuivre. Le caractère indispensable de Cu dans la réduction de N_2O a été mis en évidence indirectement dans *Pseudomonas stutzeri*, qui offrait un cadre favorable à sa détection. En effet cette espèce utilise un cytochrome cd_1 comme nitrite réductase et n'a pas de cuprédoxine, donc pas de cuivre "étranger" qui serait la source d'un bruit de fond. ZUMFT et coll. ont caractérisé l'enzyme dans cette espèce et d'autres comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter cycloclastes*, *Paracoccus denitrificans* et *Wolinella succinogenes* **[51]**. Il y a généralement deux sous-unités identiques de 66 kDa environ, et 8 atomes de cuivre en tout par dimère. Chaque monomère renferme deux centres bi-métalliques, un noyau Cu_A (dessin page suivante) contenant 2 Cu et donnant un signal en RPE, un second noyau Cu-Cu (Cu_Z) silencieux en RPE.

Le site Cu_A est désigné ainsi parce qu'il ressemble au Cu_A présent dans la sous-unité II de la cytochrome oxydase. Autrefois on croyait que cette dernière avait un élément Cu_A mono-métallique coordonné par des atomes de N et de S (2 His, 2 Cys). Le cuivre de la N_2O réductase a servi de matériel favorable à des études spectroscopiques poussées (optique, dichroïsme, RPE, RAMAN, EXAFS…) **[52]** qui ont conduit à la structure indiquée par le schéma où les deux atomes métalliques partagent leur degré d'oxydation. La ressemblance de séquence avec la sous-unité II a permis de se rendre compte que le Cu_A de la cytochrome oxydase était bi-métallique lui aussi. Une expérimentation volumineuse a été faite avec Cu_A, notamment par mutagenèse dirigée afin de modifier les résidus d'acides aminés liés aux atomes métalliques.



Structure du noyau Cu_A

Une structure consensus entre N_2O réductases provenant de six espèces bactériennes différentes concerne la portion de séquence liant Cu_A. Les résidus portant Cu_1 et Cu_2 dans le schéma sont repérés dans la séquence par les chiffres 1 et 2. Les lettres en caractère gras notent les positions identiques dans la sous-unité II des cytochrome c oxydases de trois espèces bactérienne, de la levure, du blé et de l'homme. Ces positions clés sont donc espacées de la même manière et correspondent visiblement à une architecture précise autour du noyau bi-métallique.

```
    1                                        1  1      1
EDVxHGFxxxxxxxxxxxxPQxTxxxxFxxxxPGxxWxYCxxFCHsLHxEMxxRMxVE
                                        2  2    2
```

E**D**Vx**H**GFxxxxxxxxxxxx**P**QxTxxxxFxxxxP**G**xxWxY**C**xxF**C**HsL**H**xE**M**xxRMxVE

Séquence consensus dans NosZ

La structure du second noyau bi-métallique, Cu_Z, n'est pas connue avec certitude, mais on le considère comme le site essentiel de la catalyse enzymatique. L'enzyme a des propriétés assez complexes accompagnant des variations spectrales : un état I violet (l'enzyme préparée en l'absence de O_2), un état II rose, et un état III bleu (inactif). Son mécanisme consiste peut-être à lier la molécule de N_2O (ou N=N=O) par les deux bouts, un azote sur un cuivre, un oxygène sur l'autre. On peut imaginer que le pont ainsi formé fragiliserait le substrat et arracherait l'atome d'oxygène. NO et l'ion cyanure se lient aussi à Cu_Z et sont des inhibiteurs de la réaction, ainsi que différentes molécules analogues du substrat qui sont N_3^-, NCO^- et CNS^-. L'acétylène est un autre inhibiteur. Les positions conservées suggèrent que le noyau Cu_Z est coordonné par des résidus d'histidine, mais il reste beaucoup à faire pour connaître plus précisément le fonctionnement détaillé de cette enzyme étrange qui n'a cependant pas la stricte exclusivité de la réduction de l'oxyde nitreux en azote moléculaire. La réaction a été observée dans la nitrogénase, la CO déshydrogénase, la méthionine synthase et quelques métalloprotéines contenant Fe, Cu, Ni, Co ou Mo. L'inhibition par l'acétylène est utile en pratique pour mesurer l'importance de la dénitrification dans les sols. L'échantillon est brassé en suspension pendant plusieurs heures dans un flacon fermé sous atmosphère inerte contenant 10% (en volume) d'acétylène. Le liquide contient du nitrate (1 mM) et

une source de carbone (glucose). Le N_2O formé (gazeux et dissous) est dosé par chromatographie en phase gazeuse **[53]**. Cette méthodologie a souvent servi de base aux estimations de la dénitrification sur le terrain.

Puisque nous en sommes à réfléchir sur la diversification des réductases au cours de l'évolution, voici l'occasion de faire un petit détour vers la NO réductase de *Fusarium oxysporum*. Avant de quitter la NO réductase, il convient en effet de revenir sur les **champignons dénitrifiants** dont l'existence a été signalée dans le chapitre précédent. Ils ont une NO réductase qui n'a rien à voir avec celle des bactéries. La dénitrification chez eux ne va pas jusqu'au stade du diazote, et s'arrête à l'oxyde nitreux. La section suivante est un aperçu de cette question.

6.7 - DES CHAMPIGNONS DÉNITRIFIENT

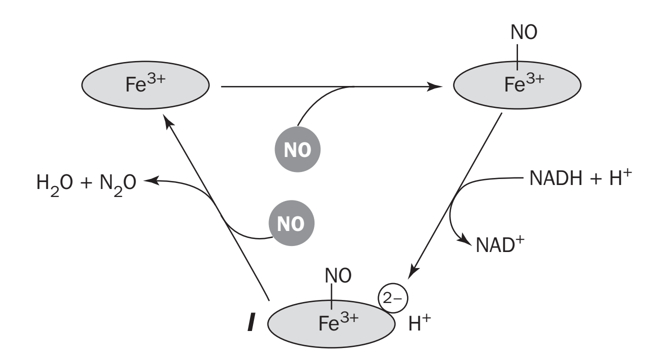
Les bactéries n'ont pas le monopole de la dénitrification. Les **champignons** la font aussi : c'est la perspective importante à laquelle nous revenons. *Fusarium oxysporum* placé en absence plus ou moins complète d'oxygène transforme le nitrate en N_2O **[54]**, et renferme une nitrite réductase à cuivre qui a été récemment purifiée **[55]**. *F. oxysporum* et *Cylindrocarpum tonkinense* ont ainsi une véritable dénitrification, qui est confirmée par les observations montrant que la réduction du nitrate et du nitrite s'effectuent au niveau des mitochondries. Il a été prouvé d'autre part que ces opérations sont couplées à une synthèse nette d'ATP **[56]**. Les outils sont différents de ceux des bactéries. Ils participeraient à la fois à la détoxification du nitrite intermédiaire et à la conservation d'énergie par couplage avec les transporteurs respiratoires. Le fait marquant est la transformation de NO en N_2O à l'aide d'une NO réductase particulière. Bien que les champignons soient des eucaryotes, la NO réductase est ici soluble, monomérique (44 kDa) et ne fait pas partie des mitochondries. Ses propriétés spectrales en absorption optique et RPE montrent que l'enzyme appartient la vaste famille des cytochromes P450, conclusion corroborée par des critères de structure et d'homologie de séquence. Que sont ces P450 ? Nous les examinerons en détail avec l'oxydation des hydrocarbures aliphatiques, mais on pourra s'en faire une idée rapide par le glossaire. Ces protéines sont habituellement des mono-oxygénases héminiques utilisant comme substrats à la fois O_2 et une source d'électrons qui sont acheminés par des éléments auxiliaires tels qu'une réductase et une ferrédoxine. La NO réductase de *Fusarium oxysporum* est un cytochrome P450 soluble tout à fait atypique, qui ne se comporte pas comme une mono-oxygénase à la façon des P450 ordinaires. On désigne ce système par **P450nor** **[57]**. La réaction globale est :

$$2\,NO + NADH + H^+ \longrightarrow N_2O + NAD^+ + H_2O,$$

L'enzyme à bas potentiel (– 307 mV) fixe NO sur son Fe^{3+}. Comme l'enzyme est monomérique et n'a qu'un seul hème à l'exclusion de tout autre cofacteur alors que la réaction implique deux molécules de NO, on peut supposer qu'une première molécule de NO se fixe sur le fer, puis réagit *in situ* avec la deuxième molécule après l'apport de deux électrons venant du NADH. Le mécanisme est différent de

celui des NO réductases bactériennes. Contrairement aux autres cytochromes P450, celui de *Fusarium* n'utilise pas O_2. Il est donc inhabituel. En outre il emploie directement du NADH comme source d'électrons sans autre intermédiaire, ce qui rappelle certains P450 des végétaux. Le P450nor est soluble comme ceux des bactéries. Son absence d'intégration à la membrane mitochondriale et l'utilisation directe de NADH, si ces caractères sont confirmés, laisseraient penser que la NO réductase de *Fusarium* ne constitue pas une étape de couplage énergétique. Une molécule de cette enzyme peut transformer plus de 1000 molécules de NO par seconde, témoignant d'une activité très forte. Certains auteurs pensent que sa fonction principale serait la détoxification de NO. Un système enzymatique similaire a été décrit chez *Cylindrocarpum tonkinense* **[58]**.

Le mécanisme utilisé par le P450nor a fait l'objet d'un examen détaillé par des auteurs japonais utilisant des techniques spectroscopiques et la cinétique rapide **[59]**. Le mécanisme serait en gros le suivant : l'enzyme fixerait une première molécule de NO puis serait réduite par deux électrons en formant un "complexe I" $[Fe^{3+}\text{-}NO]^{2-}$, H^+. Ce nouvel état très réactif recevrait la deuxième molécule de NO, provoquerait la soudure des deux atomes d'azote et l'expulsion de N_2O. Il y a donc une différence de principe avec les NO réductases bactériennes. L'événement de départ est la fixation de la première molécule de substrat, avec un changement de l'état de spin du fer et une modification conformationnelle qui active l'intervention de la source d'électrons. Le schéma est celui de SHIRO et coll., et fait état d'un transfert de deux électrons sous forme d'hydrure à partir de NADH sans oxydoréduction du fer. La réduction directe par NADH est une différence fondamentale avec les oxygénases à P450 que nous trouverons par la suite, et rend impossible l'utilisation du dioxygène.



Le cycle de la NO réductase de Fusarium

Les données cinétiques et spectroscopiques sont en faveur de l'existence de l'intermédiaire I, dont la charge se répartit en fait entre le fer et la porphyrine. Il apparaît en présence d'une mole de NO par mole d'enzyme et après addition de NADH. L'intermédiaire I disparaît rapidement après ajout d'un excès de NO. L'existence de cette NO réductase est doublement intéressante. En premier lieu cette dénitrification fongique, dont l'enzyme est une pièce particulière, laisse entendre que l'immense cohorte des champignons de la biosphère pourrait avoir des

potentialités qui restent sous-estimées. Du fait de l'importance des mécanismes anaérobies dans les biodégradations, de nombreuses espèces de champignons, moisissures, levures, apportent peut-être une contribution capitale. On peut prévoir que le champ des recherches, qui a longtemps privilégié les bactéries pour des raisons qui tiennent à la commodité des expérimentations, va s'intéresser davantage aux champignons du sol. Le deuxième pôle d'intérêt concerne la ressemblance structurale avec les autres P450 et la question de leur origine évolutive **[60]**. Le cytochrome P450 fongique pourrait être l'héritier lointain d'une forme ancestrale dont auraient divergé également les cytochromes P450 utilisateurs d'O_2 et les mono-oxygénases actuelles placées sur le devant de la scène. Le cytochrome P450 de *Fusarium* serait-il plus proche de l'origine ancestrale de toutes ces protéines ? Cette question peut réserver des surprises dans le futur, et c'est la raison pour laquelle elle a été un peu développée ici.

EN GUISE DE CONCLUSION

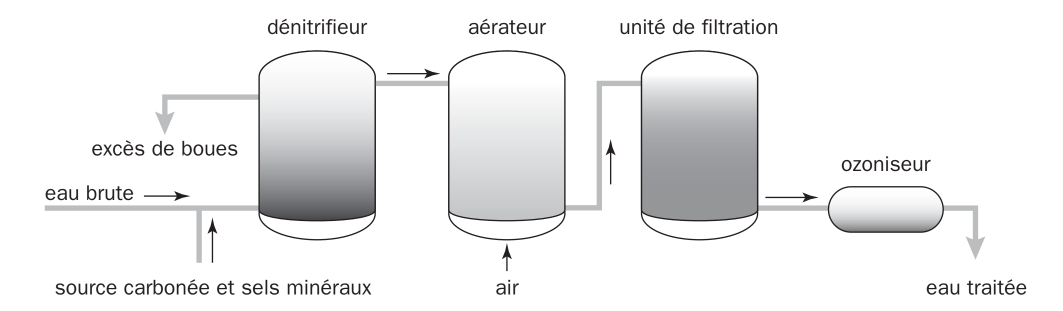
Le grand réservoir d'azote de la biosphère se trouve dans l'atmosphère, qui est constituée pour près des quatre cinquièmes par N_2. La fixation biologique de cet azote en composés organiques ou minéraux est énorme, plus de 100 millions de tonnes par an, maintenant bien davantage par suite de l'épandage des engrais, de la culture des légumineuses et de rejets industriels. La fixation de l'azote est uniquement procaryotique, et se fait aussi bien dans les sols continentaux que dans les océans. Parmi les composés dont l'accumulation risque d'avoir des effets nuisibles sur l'environnement sont les ions nitrate, l'oxyde nitrique (NO, peu abondant dans l'atmosphère) et l'oxyde nitreux (N_2O). Les deux derniers siècles ont amené une forte augmentation du nitrate retenu dans les glaces du Groenland, tandis que la teneur de l'atmosphère en N_2O augmentait régulièrement de 0,3% par an. Les nitrates ne sont pas toxiques par eux-mêmes, mais leur ingestion excessive dans les eaux de boisson induit la production de nitrite et de nitrosamines cancérigènes par la flore intestinale. L'oxyde nitrique diffuse dans le sang et réagit avec l'hémoglobine pour faire une methémoglobine inactive, créant une situation à risque connue en particulier chez les nourissons où la réduction du nitrate est favorisée par un pH intestinal plus alcalin. La methémoglobine n'assure plus le transport d'O_2. Chez l'enfant et l'adulte, le défaut est heureusement réparé en grande partie par une réductase au sein des globules rouges, sinon les effets du nitrite seraient analogues à ceux d'un empoisonnement par le monoxyde de carbone. D'après la norme en vigueur, une eau cesse d'être potable quand la teneur en nitrate excède 50 mg par litre. Le nitrate en excès tend à s'accumuler dans les plantes et des accidents ont été observés chez les animaux d'élevage par la consommation de certains fourrages. Un excès de nitrates se traduirait par une absorption d'eau accrue par les plantes jointe à une baisse de leur teneur en facteurs importants tels que la vitamine C ou le fer. Les végétaux sont la principale source de nitrites pour l'organisme humain tandis que le taux naturel du nitrate dans la viande est considéré comme insignifiant. Ces inconvénients ont conduit à

limiter l'utilisation de nitrate pour la conservation des produits alimentaires (salaisons), et même à l'interdire dans plusieurs pays.

Les nitrates sont des sels stables dans les sols aérés, mais ils sont très solubles et sont facilement entraînés par les eaux, beaucoup plus facilement que les phosphates ajoutés dans les fertilisants. En outre l'ion nitrate par sa charge négative est beaucoup moins bien retenu par les argiles et composés humiques, eux-mêmes porteurs de charges négatives. On a découvert que l'azote nitrique non consommé immédiatement par les plantes peut perdurer assez longtemps dans les sols jusqu'à ce qu'il soit facilement entraîné dans les nappes phréatiques après une période de pluie. Ces caractères font que l'épandage en excès des fertilisants nitratés est une source de pollution pour les eaux. Les pratiques de la culture intensive ont été montrées du doigt. Par exemple dans la culture du blé, un rendement de 60 quintaux à l'hectare était considéré autrefois comme correct. On dépasse maintenant 80 quintaux. Il faut alors apporter plus de 250 kg d'azote à l'hectare, compte tenu des pertes. D'après MARIOTTI **[61]**, les pertes s'additionnent au cours des années et peuvent conduire à des accumulations considérables. La dénitrification naturelle évacue vers l'atmosphère des oxydes tels que N_2O, mais comme celui-ci a un temps de résidence très long, il apporte une contribution croissante à l'effet de serre. Des régions naturelles de savane, bien que pauvres en azote minéraux, seraient néanmoins rendues très fertiles avec suffisamment d'eau, car l'azote y intervient en circuit fermé. Les matières végétales mortes produisent de l'ammonium qui est facilement retenu grâce à sa charge positive par l'argile et l'humus. Cet azote ammoniacal n'est pratiquement pas nitrifié et les plantes le récupèrent sur place avec un minimum de pertes. Les plantes adaptées auraient donc la capacité d'utiliser efficacement NH_3 sans dépendre de la nitrification dans le sol. L'agriculture intensive n'est pas seule responsable de la charge en nitrate des rivières et des eaux côtières dans les régions où existent des élevages industriels. Le rejet des lisiers a été incriminé, par exemple en Bretagne. Des marées vertes sont apparues le long du littoral. L'excédent de nitrate amené par les rivières y déclenche une prolifération d'algues et de phytoplancton. La Vilaine, la Rance, l'Elorn et la Loire déversent parfois dans la mer des eaux colorées. La couverture des eaux par les ulves perturbe l'équilibre biologique sous-jacent et encourage une prolifération intense de dinoflagellés, *Alexandrium minutum* et *Dinophysis*, qui présentent un risque toxique important. Ces organismes sont responsables des "eaux rouges", se concentrent dans les bivalves et les rendent impropres à la consommation à cause des toxines qu'ils sécrètent. On a également relevé des teneurs anormales en pesticides, notamment dans plusieurs rivières bretonnes. Le problème a pris des dimensions préoccupantes et parfois scandaleuses. Ces dernières années en France, l'eau potable était produite pour 60% à partir des nappes souterraines par captage ou forage profond. Le reste était pompé dans les fleuves, les rivières et les lacs et distribué après retraitement.

Comment peut-on éliminer les nitrates ? Un procédé parmi d'autres consiste à utiliser le pouvoir dénitrifiant des bactéries en anaérobiose, à condition qu'elles puissent se développer avec des ressources nutritives présentes ou ajoutées dans l'eau polluée. Des minéraux et une source carbonée, qui sera détruite au cours du traitement, permettent d'activer le développement des germes. Voici pour

illustration le principe d'une installation où une étape de dénitrification sans air (avec perfusion éventuelle d'azote) est suivie d'une épuration par aération, et enfin d'une filtration.



La nécessité moderne de lutter contre l'excès de nitrate dans les eaux a stimulé de gros efforts techniques. Des procédés utilisent l'osmose inverse, l'échange d'ions, l'électrodialyse combinée à un bioréacteur à membrane, ou encore une filtration sur des membranes à céramiques retenant les bactéries dénitrifiantes, mais les quantités à traiter et les prix de revient sont évidemment des facteurs déterminants.

Références

[1] Krafft T, Bokranz M, Klimmek O, Schroder I, Fahrenholz F, Kojro E & Kroger A (1992) *Eur. J. Biochem.* **206** : 503-510.

[2] Johnson JL, Rajagopalan KV, Mukund S & Adams MW (1993) *J. Biol. Chem.* **268** : 4848-4852 ; Kletzin A & Adams MW (1996) *FEMS Microbiol. Rev.* **18** : 5-63.

[3] Hinton SM & Dean D (1990) *Crit. Rev. Microbiol.* **17** :169-188.

[4] Johnson JL,Bastian NR & Rajagopalan KV (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **87** : 3190-3194.

[5] Higgins CF (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* **8** : 67-113 ; Ehrmann M, Ehrle R, Hofmann E, Boos W & Schlösser A (1998) *Molecular Microbiol.* **29** : 685-694.

[6] Hinton SM & Mortensen LE (1985) *J. Bacteriol.* **162** : 485-493.

[7] Boyington JC, Gladyshev VN, Khangulov SV, Stadtman TC & Sun PD (1997) *Science* **275** : 1305-1308.

[8] Antipov AN, Lyalikova NN, Khijniak TV & L'vov NP (1998) *FEBS Lett.* **44** : 257-260.

[9] Blasco F, Pommier J, Augier V, Chippaux M & Giordano G (1989) *Mol. Microbiol.* **6** : 221-230.

[10] Siddiqui RA, Warnecke-Ebertz U, Hengsberger A, Schneider B, Kostka S & Friedrich B (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 5867-5876 ; Reyes F, Roldan MD, Klipp W, Castillo F & Moreno-Vivian C (1996) *Molec. Microbiol.* **19** : 1307-1318.

[11] Lin JT, Goldman BS & Stewart V (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 2551-25559.

[12] de Moss JA & Hsu PY (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 3303-3310.

[13] BLASCO F, NUNZI F, POMMIER J, BRASSEUR R, CHIPPAUX M & GIORDANO G (1992) *Mol. Microbiol.* **6** : 209-219.

[14] LIU X, DEMOSS JA (1997) *J. Biol. Chem.* **272** : 24266-24271 ;
BLASCO F, DOS SANTOS JP, MAGAON A, FRIXON C, GUIGLIARELLI B, SANTINI CL & GIORDANO G (1998) *Mol. Microbiol.* **28** : 435-447.

[15] AUGIER V, ASSO M, GUIGLIARELLI B, MORE C, BERTRAND P, SANTINI CL, BLASCO F, CHIPPAUX M & GIORDANO G (1993) *Biochemistry* **32** : 5099-5108.

[16] MAGALON A, LEMESLE-MEUNIER D, ROTHERY RA, FRIXON C, WEINER JH & BLASCO F (1997) *J. Biol. Chem.* **272** : 25652-25658.

[17] BRYK R, GRIFFIN P & NATHAN C (2000) *Nature* **407** : 211-215.

[18] PEREIRA IC, ABREU IA, XAVIER AV, LEGALL J & TEIXEIRA M (1996) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **224** : 611-618.

[19] YAMANAKA T (1992) *In "The Biochemistry of Bacterial Cytochromes",* Springer Verlag KG, Berlin ;
HENRY Y & BESSIÈRES P (1984) *Biochimie* **66** : 259-289 ;
SIVESTRINI MC, GALEOTTI L, GERVAIS M, SCHININÀ E, BARRA D, BOSSAA F & BRUNORI M (1994) *Biochimie* **76** : 641-654.

[20] FÜLÖP V, MOIR JWB, FERGUSON SJ & HAJDU J (1995) Cell **81** : 369-377.

[21] WILLIAMS PA, FÜLOP V, GARMAN EF, SAUNDERS NFW, FERGUSON SJ & HAJDU J (1997) *Nature* **389** : 406-412.

[22] NAR H, MESSERSCHMIDT A, HUBER R, VAN DE KAMP M & CANTERS GW (1991) *J. Mol. Biol.* **221** : 765-772.

[23] FARVER O, EADY RR, ABRAHAM ZH & PECHT I (1998) *FEBS Lett.* **436** : 239-242.

[24] SUZUKI S, YOSHIMURA T, KOZHUMA T, SHIDARA S, MASUKO M, SAKURAI T & IWASAKI H (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **164** : 1366-1372 ;
HULSE CL, AVERILL BA & TIEDJE JM (1989) *J. Amer. Chem. Soc.* **111** : 2322-2323 ;
HOWES BD, ABRAHAM ZHL, LOWE DJ, BRÜSER T, EADY RR & SMITH BE (1994) *Biochemistry* **33** : 3171-3177.

[25] ADMAN ET, GODDEN JW & TURLEY S (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 27458-27474.

[26] MURPHY ME, TURLEY S & ADMAN ET (1997) *J. Biol. Chem.* **272** : 28455-28460.

[27] MASUKO M & IWASAKI H (1984) *Plant Cell. Physiol.* **25** : 439-446 ;
JACKSON MA, TIEDJE JM & AVERILL BA (1991) *FEBS Lett.* **291** : 41-44.

[28] KUKIMOTO M, NISHIYAMA M, TANOKURA M, ADMAN ET & HORINOUCHI S (1996) *J. Biol. Chem.* **271** : 13680-13683 ;
DODD FE, VAN BEEUMEN J, EADY RR & HASNAIN SS (1998) *J. Mol. Biol.* **282** : 369-382.

[29] SHOUN H, KANO M, BABA I, TAYAKA N, MATSUO M (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 4413-4415.

[30] EAVEC DJ, GROVE J, STAUDENMANN W, JAMES P, POOLE RK, WHITE SA, GRIFFITHS I & COLE JA (1998) *Molec. Microbiol.* **28** : 205-216.

[31] LIU MC & PECK HDJ (1981) *J. Biol. Chem.* **256** : 13159-13164.

[32] BLACKMORE R, ROBERTSON A & BRITTAIN T (1986) *Biochem. J.* **233** : 547-552.

[33] SCHUMACHER W, HOLE U & KRONECK PMH (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **205** : 911-916 ;
EINSLE O, MESSERSCHMIDT A, STACH P, BOURENKOV GP, BARTUNIK HD, HUBER R & KRONECK PMH (1999) *Nature* **400** : 476-480.

[34] PEREIRA IC, ABREU IA, XAVIER AV, LEGALL J & TEIXEIRA M (1996) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **224** : 611-618.

[35] MORENO C, COSTA C, MOURA I, LE GALL J, LIU MY, PAYNE WJ & VAN DIJK C & MOURA JJ. (1993) *Eur. J. Biochem.* **212** : 79-86.

[36] IGARASHI N, MORIYAMA H, FUJIWARA T, FUKUMORI Y & TANAKA N (1997) *Nature Struct. Biol.* **4** : 276-284.

[37] FRUNZKE K & MEYER O (1990) *Arch. Microbiol.* **154** : 168-174.

[38] YOSHINARI T (1980) *Appl. Environ. Microbiol.* **39** : 81-84 ;
TERAGUCHI S & HOLLOCHER TC (1989) *J. Biol. Chem.* **264** : 1972-1979.

[39] HEISS B, FRUNZKE K & ZUMFT WG (1989) *J. Bacteriol.* **171** : 3288-3297 ;
JONES AM & HOLLOCHER TC (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1144** : 359-366 ;
ZUMFT WG, BRAUN C & CUYPERS H (1994) *Eur. J. Biochem.* **219** : 481-490 ;
KASTRAU DHW, HEISS B, KRONECK PMH & ZUMFT WG (1994) *Eur. J.* **222** : 293-303 ;
GIRSCH P & DE VRIES S (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1318** : 202-216.

[40] COYLE C, ZUMFT WG, KRONECK PMH, KÖRNER H & JAKOB W (1985) *Eur. J. Biochem.* **153** : 459-467 ;
RIESTER J, ZUMFT WG & KRONECK PMH (1989) *Eur. J. Biochem.* **178** : 751-762 ;
SOOHOO CK & HOLLOCHER TC (1991) *J. Biol. Chem.* **266** : 2203-2209 ;
SOOHOO CK, HOLLOCHER TC, KOLODZIEJ AF, ORME-JOHNSON H & BUNKER G (1991) *J. Biol. Chem.* **266** : 2210-2218.

[41] GIRSCH P & DE VRIES S (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1318** : 202-216.

[42] ZUMFT WG, BRAUN C & CUYPERS H (1994) *Eur. J. Biochem.* **219** : 481-490.

[43] VAN DER OOST J, DE BOER AP, DE GIER JW, ZUMFT WG, STOUTHAMER AH & VAN SPANNING RJ (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* **121** : 1-9.

[44] DE GIER JW, SCHEPPER M, REIJNDERS WN, VAN DYCK SJ, SLOTBOOM DJ, WARNE A, SARASTE M, KRAB K, FINEL M, STOUTHAMER AH, VAN SPANNING RJ & VAN DER OOST J (1996) *Mol. Microbiol.* **20** : 1247-1260.

[45] YE RW, AVERILL BA & TIEDJE JM (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 1053-1058.

[46] HASKIN CJ, RAVI N, LYNCH JB, MÜNCK E & QUE L (1995) *Biochemistry* **34** : 11090-11098 ;
VERPLAETSE J, VAN TORNOUT P, DEFREYN G, WITTERS R & LONTIE R (1979) *Eur. J. Biochem.* **95** : 327-331 ;
BRUDVIG GW, STEVENS TH & CHAN SI (1985) *Biochemistry* **19** : 5275-5285.

[47] FUJIWARA T & FUKUMORI Y (1996) *J. Bacteriol.* **178** *:* 1866-1871.

[48] CASTRESANA J & SARASTE M (1995) *Trends in Biochem. Sci.* **20** : 443-448.

[49] PICHINOTY F, MANDEL M, GREENWAY B & GARCIA J-L (1979) *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **128A** : 75-87 ;
HUTCHINS SR (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 2403-2407.

[50] KUNDU B & NICHLAS DJD (1985) *Arch. Microbiol.* **140** : 358-364 ;
PARSONAGE D, GREENFIELD AJ & FERGUSON SJ (1986) *Arch. Microbiol.* **145** :191-196 ;
RICHERDSON DJ, BELL LC, MCEWAN AG, JACKSON JB & FERGUSON SJ (1991) *Eur. J. Biochem.* **199** : 677-683.

[51] ZUMFT WG & MATSUBARA T (1982) *FEBS Lett.* **148** : 107-112 ;
ZUMFT WG, DÖHLER K, KÖRNER S, LÖCHELT S, VIEBROCK A & FRUNZKE K (1988) *Arch. Microbiol.* **149** : 492-498.

[52] KRONECK PMH, ANTHOLINE WA, RIESTER J & ZUMFT WG (1988) *FEBS Lett.* **242** : 70-74 ; JIN H, THOMANN H, COYLE CL & ZUMFT WG (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111** : 4262-4269.

[53] TIEDJE JM (1994) *In "Methods of Soil Analysis"* part 2, WEAVER RW, ANGLE JS & BOTTOMLEY PJ eds, Soil Sci. Society of America, Madison, Wis. : 245-267.

[54] SHOUN H & TANIMOTO T (1991) *J. Biol. Chem.* **266** : 11078-11082.

[55] KOBAYASHI M & SHOUN H (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 4146-4151.

[56] KOBAYASHI M, MATSUO Y, TAKIMOTO A, SUZUKI S, MARUO F & SHOUN H (1996) *J . Biol. Chem.* **271** : 16263-16267.

[57] SHOUN H & TANIMOTO T (1991) *J. Biol. Chem.* **266** : 11078-11082 ; SHIRO Y, FUJII M, ISOGAI Y, ADACHI SI, LIZUKA T, OBAYASHI E, MAKINO R, NAKAHARA K & SHOUN H (1995) *Biochemistry* **34** : 9052-9058 ; NAKAHARA K & SHOUN H (1996) *J. Biochem.* **120** : 1082-1087.

[58] TORITSUKA N, SHOUN H, SINGH UP, PARK SY, IZUKA T & SHIRO Y (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1338** : 93-99.

[59] SHIRO Y, FUJII M, IIZUKA T, ADACHI SI, TSUKAMOTO K, NAKAHARA K & SHOUN H (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 1617-1623.

[60] OKAMOTO N, IMAI Y, SHOUN H & SHIRO Y (1998) *Biochemistry* **37** : 8839-8847.

[61] MARIOTTI A (1998) *Pour La Science* **249** : 60-65 ; MARIOTTI A (1994) *Hydrogéologie* **3** : 43-68.

Chapitre 7

Oxydations anaérobies diverses

Nous savons que le potentiel électrochimique membranaire est une forme de stockage de l'énergie directement produite par les oxydoréductions respiratoires. Quand l'oxygène fait défaut, les respirations dites anaérobies prennent le relais en utilisant des accepteurs de remplacement. La dénitrification est l'une des solutions. D'autres respirations sont tout aussi importantes et maintes biodégradations en sont tributaires. Dans ce chapitre sont examinées quelques-unes de celles qui apparaissent comme les principales. Certaines sont surprenantes, comme l'intervention de l'humus du sol ou du fumarate. Mais la réduction du sulfate et des composés soufrés a une fonction majeure dans l'environnement partout où ils sont abondants. La réduction d'éléments métalliques, comme le fer et le manganèse, est tout aussi importante et représente peut-être un mécanisme énergétique très ancien de l'histoire de la vie. Nous terminerons par une surprise que nous offrent les halorespirations, où les accepteurs sont des dérivés chlorés ou des oxydes de chlore, dont certains sont des produits polluants répandus par l'industrie. La respiration anaérobie est réservée essentiellement aux procaryotes et reste exceptionnelle chez l'énorme majorité des eucaryotes dont le développement normal est tributaire de l'oxygène.

7 – Oxydations anaérobies diverses

Le potentiel électrochimique membranaire est une forme de stockage de l'énergie. Celle-ci est utilisée directement, notamment pour des transports actifs ou la mobilité (rotation des flagelles), ou convertie secondairement en ATP par l'ATP synthase de type F_0F_1. Sa présence inhibe le fonctionnement des autres formes de respiration, soit en bloquant indirectement l'expression des gènes concernés, soit en inhibant directement les enzymes qui participent. Les accepteurs de remplacement sont généralement des produits abondants dans l'environnement, ou engendrés par voie biologique, mais leur utilisation à des fins respiratoires est réservée aux procaryotes. La respiration anaérobie n'est qu'exceptionnelle chez les eucaryotes qui restent tributaires de l'oxygène dans leur énorme majorité pour tout développement normal.

7.1 - Des accepteurs variés et inattendus

Les biotopes anaérobies n'ont que l'embarras du choix pour remplacer l'oxygène, qui est l'accepteur au potentiel le plus élevé. Nous avons déjà rencontré les nitrates et autres oxydes d'azote. D'autres accepteurs respiratoires extrêmement importants dans la nature sont divers composés soufrés dont le **sulfate**, des **métaux** comme Fe(III), Mn(IV), une foule de composés organiques halogénés ou non dont la liste ne cesse de s'allonger, et même certains constituants du sol. Parmi ces derniers, l'**humus** figure en bonne place. Un accepteur répandu est le **fumarate**. Ce composé est un intermédiaire métabolique des oxydations aérobies dans le cycle de Krebs, où il est formé à partir du succinate. La réaction inverse s'observe en anaérobiose, où la réduction du succinate en fumarate évoque une fermentation. Une véritable fermentation devrait conduire directement à une formation d'ATP, mais dans bien des cas la réduction du fumarate ne correspond pas à une fermentation, parce que la réaction est couplée avec une extrusion de protons à travers la membrane et représente une respiration anaérobie. D'autres métabolismes respiratoires découverts récemment utilisent des composés aromatiques et des dérivés chlorés. Enfin nous savons que la **méthanisation** est une respiration d'un genre particulier où le gaz carbonique servirait d'accepteur.

L'énergie récupérée par respiration anaérobie est d'autant plus grande que la différence de potentiel d'oxydoréduction entre le donneur et l'accepteur est la plus grande. Comme aucun accepteur n'est aussi favorable que l'oxygène avec son

potentiel de 810 mV, toutes les espèces fonctionnant en anaérobiose facultative ont des systèmes régulateurs leur permettant d'abandonner aussitôt tout accepteur de remplacement après un retour à l'oxygène. L'hydrogène moléculaire n'est pas loin de l'autre extrémité de l'échelle, avec un potentiel standard de 2 H^+/H_2 égal à – 430 mV (pH 7) [1]. Nous examinerons dans ce chapitre des respirations anaérobies sur différents accepteurs autres que les oxydes d'azote, comme le sulfate. D'autres sont moins évidents et nous allons commencer par quelques exemples naturels : l'humus, le fumarate et certains oxydes organiques.

Le terme d'**humus** évoque une matière du sol essentielle à la croissance de beaucoup de plantes, l'âme en quelque sorte de la terre des jardins, des champs et des forêts. Il est constitué de nombreux éléments hétérogènes, dont beaucoup sont récalcitrants et ont par conséquent une très longue vie moyenne. Sa composition est un sujet complexe, et dépend énormément du lieu, du climat, de la végétation et de la nature du sol. Quelques détails sur la composition de l'humus sont donnés en glossaire. Les éléments quinoniques de l'humus participent à des oxydoréductions biologiques parce que leur potentiel est situé dans la gamme physiologique de + 100 à + 300 mV en fonction de l'environnement moléculaire et de l'hydratation. Ils interviennent dans deux catégories de situations. Dans la première, les éléments humiques servent d'accepteurs d'électrons dans des respirations anaérobies effectuées par des *Geobacter* et *Shewanella*, et sont réduits principalement sous forme hydroquinonique. Dans la deuxième, l'humus réduit est oxydé en anaérobiose dans d'autres respirations qui l'oxyde par divers accepteurs d'électrons comme l'ion nitrate ou le fer ferrique. La transformation intervient en deux temps. L'humus est d'abord réduit, principalement au niveau des sites quinoniques, puis il est oxydé à nouveau par d'autres accepteurs respiratoires à potentiel plus élevé. Surprenant ! L'anaérobiose voit donc se dérouler un cycle d'oxydoréduction particulier concernant l'humus, dont certains composants peuvent osciller entre les états oxydé et réduit. En servant d'intermédiaire dans les échanges d'énergie du sol à l'abri de l'air, l'humus assume ainsi une fonction biologique importante dans l'environnement. Il a aussi la fonction physicochimique d'une substance ballast capable de retenir l'eau et douée de propriétés adsorbantes qui interviennent sur la rémanence et la mobilité des éléments qui traversent le sol. Par exemple des produits polluants peuvent être retenus et donner du temps à la microflore du sol pour les dégrader, ou au contraire les abandonner à un lessivage rapide conduisant à la contamination des nappes phréatiques et des rivières. Le coefficient de partage entre la fraction circulante d'un produit dans le sol et la partie adsorbée sur les particules solides est désigné par *Koc**, un paramètre qui intervient dans la vitesse des biodégradations.

Cette respiration inédite sur groupes quinoniques de l'humus oxyderait non sélectivement une très grande variété de substrats dans le sol. Les exemples courants sont le glucose issu de l'hydrolyse de la cellulose, des acides aminés et des produits de fermentation (acétate, lactate, propionate, butyrate, éthanol), sans omettre

---

1 - Le potentiel du couple protons-hydrogène peut s'élever facilement à – 350 mV dans la réalité, parce que le gaz hydrogène est toujours très dilué dans les conditions naturelles.

l'hydrogène. De l'autre côté de la chaîne, les accepteurs à potentiel plus élevé qui réoxydent l'humus sont principalement le nitrate, le fer et le fumarate. L'intervention du sulfate n'a pas été démontrée. Ces opérations alternées de réduction et d'oxydation sont effectuées surtout par des bactéries Gram-négatives sans proche parenté entre elles. Leur détection est facilitée par l'emploi d'un substrat artificiel imitant l'humus réduit, qui est l'*AHDS**. Les recherches récentes montrent donc que l'humus est loin d'être une réserve carbonée relativement inerte dans le sol, mais a un rôle dynamique considérable comme support biologique fondamental de fertilité et d'évolution des sols.

Le fumarate offre une autre situation originale, parce que c'est un intermédiaire bien connu du métabolisme. La réduction du fumarate en succinate par la fumarate réductase est l'ultime étape de cette respiration et semble très répandue chez de nombreuses espèces bactériennes. Elle est inverse de la réaction de la succinate déshydrogénase dans le cycle de KREBS (le complexe II mitochondrial) :

$$^{-}OOC–CH=CH–COO^{-} + 2\,e^{-} + 2\,H^{+} \longrightarrow {}^{-}OOC–CH_2–CH_2–COO^{-}$$

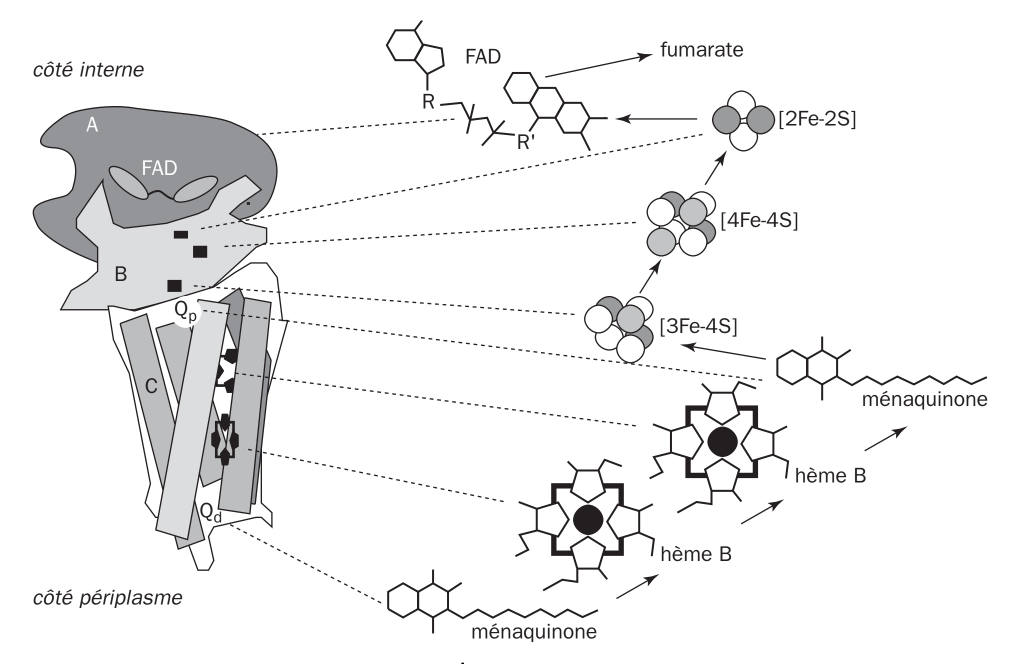
Le remplacement de cette enzyme par la fumarate réductase s'effectue chez *E. coli* au cours du passage à l'anaérobiose. Chose curieuse, les deux enzymes se ressemblent par leur structure et leurs cofacteurs, ont toutes deux 4 sous-unités dont deux sont insérées dans la membrane. Les sous-unités sont codées par deux opérons homologues, mais l'ordre des gènes diffère : *frdABCD* pour la réductase, *sdhCDAB* pour la déshydrogénase [2]. Les deux enzymes peuvent même se remplacer mutuellement pour assurer la croissance dans des cas particuliers, et sont enchassées dans la membrane sous forme de dimères **[1]**. La fumarate réductase reçoit les électrons par une **ménaquinone** mobile au sein de la membrane. Les ménaquinones qui diffèrent les unes des autres comme les ubiquinones par la longueur de leur chaîne latérale sont aussi lipophiles et fonctionnent de la même façon. Elles sont préférées en anaérobiose par leur potentiel plus bas.

La structure de l'enzyme a été déterminée chez le colibacille **[2]**, et *Wolinella succinogenes* **[3]**. Dans le premier cas les quatre sous-unités forment un complexe de 121 kDa renfermant une flavoprotéine (66 kDa) avec FAD lié de façon covalente, une protéine fer-soufre (27 kDa) et deux protéines assez similaires logées dans la membrane (sous-unités C et D). L'enzyme de *Wolinella*, n'a qu'une seule sous-unité membranaire qui remplace C et D dans le monomère et comporte 5 hélices transmembranaires. Elle est représentée par la figure de la page suivante.

L'ensemble renferme une chaîne de transporteurs d'électrons qui part de la membrane sur sa face périplasmique, avec la ménaquinone réduite comme donneur. La partie membranaire a deux sites de liaison pour ménaquinone, dont l'un situé entre les deux sous-unités dans un environnement hydrophobe. Ces deux sites sont assez distants et occupent *grosso modo* des positions opposées de part et d'autre de la membrane. On les désigne respectivement par Q_D (distal) et Q_P (proximal).

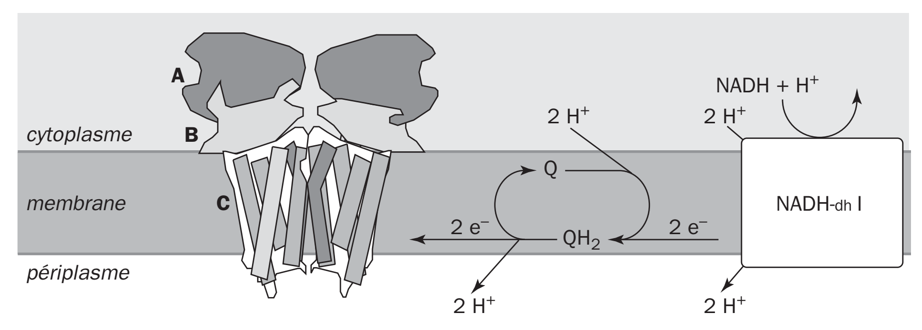
---

2 - L' homologie se retrouve également dans la succinate déshydrogénase mitochondriale, qui est cependant plus compliquée avec des constituants supplémentaires. La déshydrogénase et la réductase sont groupées sous le même code EC 1.3.5.1 comme succinate : quinone oxydoréductases.



Fumarate réductase de Wolinella

Le site Q_P est au voisinage immédiat du noyau fer-soufre [3Fe-4S], de potentiel – 70 mV, probablement le maillon suivant dans la chaîne. Il y a deux autres noyaux fer-soufre, un [4Fe-4S] de – 320 mV et un [2Fe-2S] de – 20 à – 79 mV. Chez *Wolinella* deux hèmes B superposés à peu près perpendiculaires au plan de la membrane sont situés entre les sites Q_P et Q_D comme dans un complexe bc_1. La présence de ces porphyrines est variable chez les autres espèces (absentes dans le colibacille), mais l'organisation générale obéirait au même principe. Elle suggère l'existence d'un **cycle Q** défini au premier chapitre, avec réduction et prélèvement de deux protons du côté interne de la membrane à la position Q_D, oxydation et libération de deux protons de l'autre côté en Q_P. Ces échanges contribuent ainsi au potentiel membranaire dont le principe est indiqué par un dessin. Il n'y a cependant pas de preuve expérimentale d'une conservation d'énergie comparable chez toutes les espèces et il n'existe peut-être qu'un cycle quinonique ordinaire dans la respiration sur fumarate chez *E. coli.*



Respiration sur fumarate

La membrane cytoplasmique est imperméable au passage des molécules ioniques comme le fumarate sans l'aide de transporteurs. *Escherichia coli* possède un antiporteur des acides dicarboxyliques à 4 atomes de carbone (**DcuA**) qui fait l'échange fumarate/aspartate, et un antiporteur fumarate/malate (**DcuB**). Ces outils vont de pair avec la fumarate réductase et sont bien connus surtout chez les Gram-négatifs. Le caractère membranaire de la fumarate réductase connaît des exceptions. Chez deux *Shewanella*, la réaction est catalysée par un flavocytochrome du périplasme, mais avec une structure de site et un mécanisme au niveau du FAD qui restent comparables **[4]**.

D'autres composés récupérés de l'environnement fonctionnent comme accepteurs d'une façon similaire. On prendra comme exemples le **diméthyl sulfoxyde** (DMSO) et l'**oxyde de triméthylamine** (ou triméthylamine oxyde, TMAO), qui sont des produits naturels répandus dans la biosphère. Leur réduction comme accepteurs terminaux d'une chaîne d'oxydoréductions est la base d'un mécanisme respiratoire.

Le DMSO est connu des chimistes comme un excellent solvant miscible à l'eau, mais c'est aussi un produit naturel formé par l'oxydation du diméthylsulfure provenant de la décomposition des matières organiques et de l'activité du phytoplancton marin. La respiration sur DMSO a été étudiée en détail chez *Escherichia coli* **[5]**. La réductase terminale fait partie d'un complexe de trois éléments DmsABC qui est produit par les bactéries en absence d'oxygène et de nitrate. Il est caractéristique de systèmes appartenant à une même famille comprenant aussi la TMAO réductase. La réductase **DmsA** contient un cofacteur à molybdène de type MGD comme celui de la nitrate réductase, mais il est ici un peu plus compliqué puisque le molybdène est lié à deux unités dinucléotidiques au lieu d'une.

Cofacteur bis (MGD)-Mo

Le composant **DmsB** agit à la manière d'une ferrédoxine et comporte 4 noyaux [4Fe-4S] dont les potentiels s'échelonnent entre – 50 et – 330 mV. L' élément membranaire **DmsC** est nécessaire à l'ancrage du dimère DmsA/DmsB à la membrane du côté cytoplasmique et servirait aussi à faciliter le transfert des électrons de la ménaquinone réduite (MQH_2) à DmsB. Chez *Rhodobacter capsulatus*, un cytochrome spécial contenant 5 hèmes de type C remplace la pièce membranaire DmsC et sert de porte d'entrée des électrons à partir des quinones **[6]**.

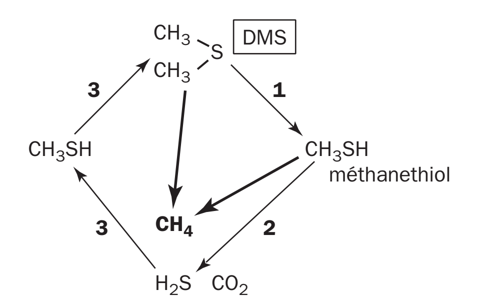
Complexe de la DMSO réductase

La spécificité de la DMSO réductase s'étend à divers substrats analogues au DMSO, tels que des pyridine-oxydes et le TMAO, et présente des similitudes remarquables avec la réductase du TMAO, qui est très spécifique de son substrat **[7]**. La mutagenèse dirigée permet de transformer assez facilement une DMSO réductase en TMAO réductase spécifique et vice versa. Ces recherches ont permis de renforcer l'idée qu'on se faisait des enzymes à molybdène dans l'environnement, en dehors de la nitrate réductase. Le mécanisme chimique représenté de façon simplifiée est celui de GARTON et coll. **[8]**. Le molybdène, entouré de 6 ou 5 coordinences dont l'une est sur un résidu sérine de la protéine, change de degré d'oxydation électron par électron au cours du cycle catalytique. Celui-ci est en grande partie réversible.

Catalyse avec molybdène

Une transformation intéressante en anaérobiose minéralise le **DMS** en H_2S et en CO_2 ou en CH_4. Cette opération est particulièrement active en milieu lagunaire, où les méthanogènes et les bactéries sulfato-réductrices entrent en compétition. Ce sont en principe les plus grands utilisateurs de DMS, mais la part de méthane fait à partir de celui-ci dans les sédiments peut atteindre 25%. Une autre

transformation anaérobie à laquelle participent les méthanogènes est l'élaboration du sulfure de méthyle ou méthanethiol (**CH_3SH**), qui est également transformé en sulfure de carbonyle (COS) par action photochimique. Le sulfure de méthyle apparaît aussi dans l'intestin animal comme un produit de détoxification de H_2S (produit par la décomposition des protéines), un gaz extrêmement toxique s'il venait à s'accumuler. Il existe donc un cycle du DMS où le métabolisme soufré est interconnecté à celui du groupe méthyle.

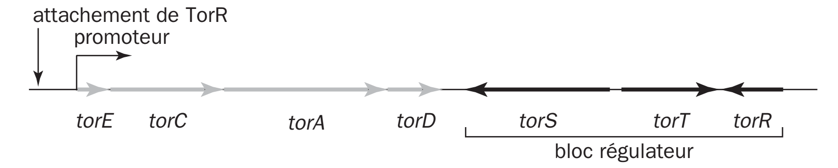


1 - DMS mono-oxygénase
2 - méthanethiol oxydase
3 - thiol-S-méthyltransférase
4 - méthanogènes

Cycle du diméthylsulfure

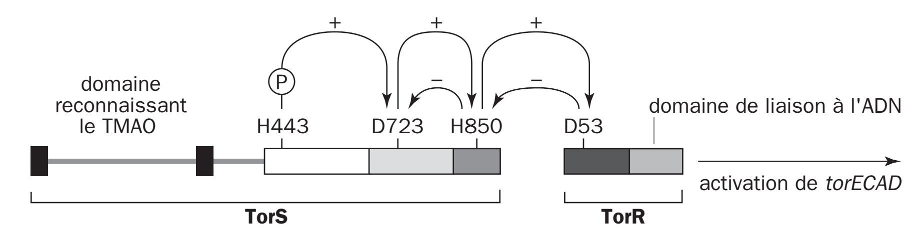
L'oxyde de triméthylamine ou **TMAO** est un constituant répandu chez les invertébrés marins et les poissons, où il participe conjointement au glycérol et à l'urée au maintien de la pression osmotique du milieu intérieur. Les systèmes respiratoires utilisant le TMAO sont connus depuis longtemps dans *E. coli*, *Rhodobacter*, *Shewanella* et *Vibri* **[9]**. On y observe jusqu'à présent trois éléments structuraux comprenant une réductase périplasmique à molybdène (**TorA**), un cytochrome à 5 hèmes C attaché à la membrane (**TorC**) et une protéine **TorD** considérée comme stabilisatrice. Le complexe de *E. coli* est commandé par l'opéron *torCAD*, régulé par un système particulier à deux composants, **TorS/TorR**. Le système Tor de *Shewanella* renferme un élément supplémentaire, TorE de fonction mal connue, dont le gène fait partie d'un opéron *torECAD*. La respiration sur TMAO se met en route sous l'effet de deux facteurs principaux : l'anaérobiose et la présence de TMAO. Les modalités diffèrent selon les espèces.

Voici pour illustration l'unité génétique, longue de 9 kb, qui permet à un *Shewanella* de respirer sur TMAO. À côté de l'opéron *torECAD* se trouvent des gènes codant pour des protéines régulatrices. La détection du TMAO, agissant comme inducteur, se fait par TorS, l'anaérobiose peut-être par TorT. TorR est un activateur de transcription, reconnu en amont de l'opéron (à gauche sur le plan) et stimulant sa transcription **[10]**.



Gènes tor de Shewanella oneidensis

Le tandem de protéines TorS-TorR constitue un système régulateur à deux composants sur le mode usuel. TorS est un capteur lié à la membrane, chargé de fixer le TMAO présent à l'extérieur et agissant comme récepteur. Il s'auto-phosphoryle sur histidine, et phosphoryle à son tour un activateur de transcription, ici TorR. Un schéma simplifié indique les domaines successifs de la séquence d'acides aminés.



Système régulateur TorS/TorR

La protéine TorS, qui sert de capteur, est construite de façon modulaire, avec un domaine extérieur capable de lier le TMAO, des portions qui traversent la membrane (rectangles noirs), et les domaines cytoplasmiques phosphorylables sur **histidine** (**H**) ou sur **aspartate** (**D**). Les numéros sont les positions dans la séquence de 1100 acides aminés. La première phosphorylation est catalysée par TorS elle-même (une autokinase) et se fait sur H443 à partir de l'ATP. La protéine TorS ainsi phosphorylée sur histidine en TorS-P n'active pas directement TorR. Il y a d'abord successivement deux transferts internes de phosphate sur D723 puis H850. C'est à partir de cette position que TorR est phosphorylée à son tour. La protéine TorR phosphorylée sur aspartate (TorR-P) se lie en un site spécifique sur l'ADN et active la transcription de *torECAD*. La cascade de transferts successifs par ricochets (flèches avec le signe +) est la particularité essentielle. Il y a un autre détail remarquable. Quand le TMAO disparaît du milieu, l'expression des gènes *tor* est rapidement mise en veilleuse. L'aspartate phosphorylé sur TorR (D53) active l'enlèvement du phosphate sur H850, puis D723 (flèches avec le signe –). Il y a donc deux cascades antagonistes en équilibre dynamique l'une avec l'autre et la respiration sur TMAO ne fonctionne strictement que lorsque les conditions sont adéquates. Il est possible que ce type de régulation ne soit que la partie connue d'un maillage plus complexe de contrôles au sein de la cellule, où le système codé par *torSTR* agirait en même temps sur d'autres métabolismes. Il a été observé par exemple que le TMAO, qui induit la réductase correspondante, provoque la répression de la fumarate réductase dans *Shewanella*, peut-être par l'intermédiaire de TorR. Quitte à choisir entre fumarate et TMAO, la préférence est apparemment pour le second.

7.2 - DU SULFATE AU SULFURE

Les sulfates océaniques constituent le plus grand réservoir de soufre de la biosphère. Son accumulation peut s'expliquer par les émissions volcaniques et leur oxydation tout au long de l'histoire de la terre. Elle résulte aussi de l'activité des

êtres vivants. L'entrée du soufre dans les synthèses biologiques ne se fait qu'à l'état le plus réduit, c'est-à-dire au niveau d'oxydation de l'ion sulfure. On le retrouve principalement dans la cystéine et la méthionine, ainsi que dans divers produits moins abondants. En fonction de cette contrainte, les organismes ne peuvent utiliser le sulfate qu'après réduction à raison de 8 électrons par mole. Ces réductions sont pratiquées à deux fins. La première est une assimilation, qui prépare le soufre sous une forme directement utilisable par le métabolisme cellulaire. La seconde est une dissimilation, où l'ion sulfate ou des entités intermédiaires font office d'accepteurs d'électrons dans une respiration anaérobie. Parmi les organismes les plus importants dans ce contexte sont les sulfato-réducteurs.

Les bactéries sulfo-réductrices sont celles qui utilisent le soufre élémentaire (S^0) comme accepteur à l'exclusion du sulfate. Les *Desulfuromonas* utilisent obligatoirement le soufre en oxydant le succinate et l'acétate en CO_2. D'autres n'ont pas une exigence absolue en soufre et peuvent le remplacer par du fumarate ou du malate. Tous ces germes cohabitent avec les sulfato-réducteurs proprement dits. Leurs compétiteurs sont les méthanogènes, qui sont de mauvais utilisateurs de sulfate, mais réduisent facilement le soufre et d'autres composés soufrés, dont les polysulfures par une *polysulfure réductase** membranaire à molybdène.

La dissimilation du sulfate ne remplit son rôle que si des quantités importantes de composés soufrés sont transformées, bien au-delà de ce qui devrait être assimilé dans les matériaux cellulaires. Elle est fondamentalement anaérobie, et son bilan énergétique est très inférieur à celui des oxydations avec O_2. La réduction du sulfate dans les milieux marins ou côtiers a une importance majeure dans le cycle naturel du soufre et actionne un recyclage non négligeable de la matière organique. Dans les milieux continentaux et en eau douce, le sulfate étant plus rare, les organismes sulfato-réducteurs sont en compétition avec d'autres espèces anaérobies, notamment avec les acétogènes et les méthanogènes. L'accumulation d'hydrosulfure et de sulfure peut cependant atteindre des taux considérables, notamment dans les cavités naturelles en relation avec des sources thermales. Un exemple connu est la Cueva de Villa Luz (Mexique), rendue dangereuse par le gaz H_2S. Une autre grotte du même type se trouve près de Mangalia (Roumanie). Dans les espaces plus conventionnels où les sulfures sont produits en abondance par l'activité microbienne, le gaz H_2S est facilement libéré dans l'atmosphère et signale par son odeur les décompositions de matière organique.

Il semble que la réduction biologique du sulfate remonte aux périodes les plus lointaines pour lesquelles on a des traces laissées par des êtres vivants. On a trouvé au Nord-Ouest de l'Australie des indices de sulfure et de carbone organique dans des veines de barytine (formées à l'origine à partir de gypse) **[11]**. Ces dépôts seraient vieux de 3,47 milliards d'années [3]. Ils ont pu se mélanger avec des sulfures d'origine volcanique, mais l'intervention d'organismes vivants déjà complexes est attestée par un déficit en soufre-34. Les formes bactériennes modernes effectuent un fractionnement isotopique comparable. On connaît de nombreuses espèces bactériennes dissimilatrices de sulfate. Parmi les archaebactéries, les

3 - Par examen géochronologique uranium-plomb.

sulfato-réducteurs sont des hyperthermophiles vivant à plus de 80°C (*Archaeoglobus*). Il existe aussi des sulfato-réducteurs hyperthermophiles qui n'appartiennent pas aux archaebactéries. Ce sont des *Thermodesulfobacterium*, détachés des autres lignées bactériennes à une période très ancienne de l'arbre évolutif. Ces organismes font partie des nombreux thermophiles présents auprès des sources chaudes du fond des océans et dans les régions volcaniques. L'exploration de cette diversité biologique a bénéficié de la construction des plates-formes pétrolières. La plupart des autres réducteurs de sulfate vivent au-dessous de 70° et sont des δ-protéobactéries, des Gram-positifs et des formes du groupe *Nitrospira* [4]. Certaines formes sont autotrophes et assimilent CO_2 grâce à l'énergie produite par l'oxydation de l'hydrogène avec le sulfate, selon le bilan :

$$SO_4^{2-} + 4\,H_2 + 2\,H^+ \longrightarrow H_2S + 4\,H_2O$$

Ces chimio-autotrophes s'accommodent volontiers de conditions très frustes. Leur métabolisme assimile éventuellement le monoxyde de carbone, le formiate ou l'éthanol, une propriété qui existe aussi chez les acétogènes. L'archétype classique des sulfato-réducteurs vivant en eau douce est *Desulfovibrio desulfuricans*. Ce germe peut utiliser toute une série d'accepteurs respiratoires, sulfate, sulfite, thiosulfate, nitrate, nitrite. Il peut croître sur sulfate et lactate, lequel est oxydé en acétate. L'oxydation fournit de l'énergie nécessaire à la vie en autotrophie. Quand le substrat oxydé est H_2, la source de carbone est le gaz carbonique du milieu (formes hydrogénotrophes). Une autotrophie spéciale s'observe sur formiate, dont l'oxydation produit à la fois le CO_2 utilisé comme source de carbone et l'énergie nécessaire à son assimilation.

Les chimio-hétérotrophes offrent également une grande variété d'adaptations physiologiques. Certains autotrophes (*Desulfovibrio baarsii*, certains *Desulfonema*, *Desulfosarcina*) peuvent vivre en hétérotrophie par l'assimilation de sources carbonées diverses où figurent des acides gras à chaîne plus ou moins longue. D'autres formes sont strictement hétérotrophes. L'utilisation des sources carbonées permet de distinguer schématiquement deux groupes I et II.

Les sulfato-réducteurs du groupe I oxydent incomplètement jusqu'à l'acétate des sources organiques comme le lactate ou l'éthanol. L'acétate n'est pas utilisé. Des exemples sont *Desulfovibrio desulfuricans*, *D. vulgaris*, *D. salexigens*, *Desulfomonas* et une espèce formant des endospores, *Desulfotomaculum nigrificans*. Ces germes constituent la majorité des sulfato-réducteurs totaux présents dans certains sédiments **[12]**.

Les sulfato-réducteurs du groupe II font des oxydations complètes conduisant au CO_2, lequel est assimilé ou non. *Desulfovibrio baarsii*, *Desulfobacterium autotrophicum* (une espèce marine), *Desulfonema*, *Desulfobacter* sont des exemples représentatifs. Ces bactéries oxydent l'acétate par le sulfate et sont dites acétoclastiques.

---

4 - Un rameau très ancien détaché lors de la séparation des Gram-positifs et – négatifs. Des Nitrospira oxydent les nitrites.

Nous retrouvons donc l'acétate comme maillon fondamental des transformations de l'environnement. Il est libéré en amont par les acétogènes à partir de produits de fermentation. Certains sulfato-réducteurs le récupèrent, mais sont en compétition avec les méthanogènes qui le transforment en méthane. D'autres sulfato-réducteurs au contraire produisent de l'acétate par leurs oxydations incomplètes (groupe I). La compétition se mue alors en collaboration avec les méthanogènes, qui prennent facilement le dessus dans les fonds aquatiques et sédiments continentaux, lorsque le sulfate est peu abondant. Les sulfato-réducteurs ont cependant l'avantage sur les méthanogènes de tolérer de petites quantités d'O_2 et sont micro-aérophiles. La plupart de ces espèces ont un grand pouvoir d'adaptation et peuvent tirer leur ATP de deux façons, soit par potentiel membranaire généré directement par la respiration sur sulfate, soit par couplage direct au niveau du substrat par oxydation d'éthanol, de lactate et divers substrats. En somme ils peuvent combiner fermentation et respiration anaérobie. En cas de raréfaction du sulfate ou de tout accepteur, les électrons provenant des oxydations sont évacués sous forme de H_2. Aussi les sulfato-réducteurs contiennent-ils invariablement une ou plusieurs hydrogénases servant de soupapes de sécurité pour équilibrer le métabolisme.

Parmi les sulfato-réducteurs se trouvent de nombreuses espèces flagellées. D'autres se déplacent par glissement (*Desulfonema*). Le genre *Desulfotomaculum* est caractérisé par la faculté de faire des endospores. Tous les organismes que nous venons de citer n'ont pas l'exclusivité de l'emploi du sulfate comme accepteur. Cette propriété se retrouve à l'état dispersé dans divers groupes taxonomiques. Elle existe chez les *Spirillum*, *Wollinella succinogenes* et *Campylobacter* **[13]**. Enfin il est courant de voir certaines espèces délaisser le sulfate comme accepteur d'électrons, et se tourner vers d'autres composés soufrés : sulfite, thiosulfate, tétrathionate et même le soufre. L'utilisation de thiosulfate par des bactéries incapables de réduire le sulfate s'observe chez certains *Clostridium* connus pour prendre part à la formation d'hydrogène sulfuré dans les rizières.

Les bactéries réductrices du sulfate en milieu marin supportent souvent des concentrations en NaCl pouvant atteindre 2-3% et sont considérées alors comme halotolérantes. Certaines espèces ont absolument besoin de sel, soit 0,6 à 5% de NaCl pour *Desulfovibrio salexigens*, 2% pour *Desulfuromonas acetoxidans*. La source de sulfate étant inépuisable dans l'eau de mer, tous ces germes sont donc bien adaptés pour y proliférer, et acceptent facilement de se développer dans les milieux lagunaires salés ou dans la vase des estuaires où les apports organiques sont généreux. Comme le taux de sulfate dans les eaux douces est généralement bien plus faible qu'en milieu marin, les bactéries ont alors besoin d'un transport actif pour s'imbiber de sulfate. Les formes d'eau douce comme *Desulfovibrio desulfuricans* ou *Desulfobulbus propionicus* concentrent le sulfate à partir de leur milieu sous l'action du potentiel de membrane (Δp). Comme la face interne de la membrane est chargée négativement par rapport à l'extérieur, elle exerce une répulsion sur l'entrée des ions sulfate. Cet inconvénient est contrebalancé par le passage simultané et dans le même sens d'au moins deux cations, vraisemblablement trois, de façon à tirer le sulfate vers l'intérieur. Les protons font office de cations. Ce système symporteur est donc actionné par la différence de charge des deux côtés de la membrane. Les ions sulfate et les protons en excédent sont attirés

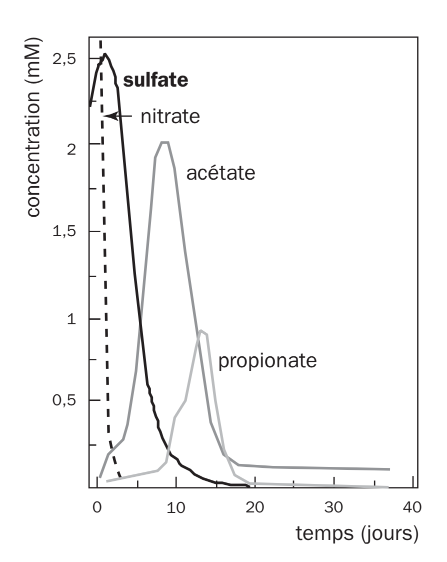
globalement vers l'intérieur. Chose curieuse, les bactéries sulfato-réductrices marines ont également un transport actif de sulfate, alors qu'elles ne devraient pas en avoir besoin. Un symporteur y commande aussi l'entrée du sulfate, mais utilise des ions sodium à la place des protons **[14]**. Une différence importante qui peut s'expliquer ainsi : les bactéries marines doivent résister à la teneur élevée en ion Na^+ de l'eau de mer (0,5 M environ), ce qui les oblige à pomper continuellement du sodium de l'intérieur vers l'extérieur. L'échange Na^+/H^+, très banal dans les cellules bactériennes, permet d'expulser le sodium en utilisant la force proton-motrice Δp qui tend à pousser les protons vers l'intérieur. Les protons entrent en échange avec les ions sodium qui sortent. En utilisant des ions sodium à la place des protons pour l'entrée des ions sulfate, les bactéries éviteraient l'inconvénient d'une acidification excessive de leur pH intracellulaire **[15]**.

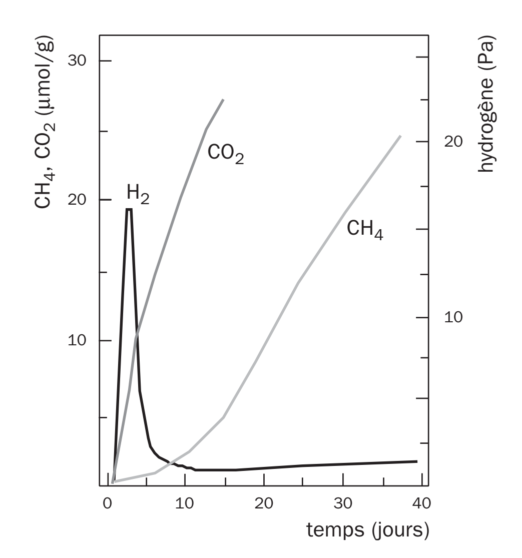
Les bactéries sulfato-réductrices des eaux douces ont été particulièrement étudiées dans les rizières où elles peuvent avoir des incidences économiques **[16]**. En terrain inondé s'établissent rapidement des conditions anaérobies, partiellement rompues au niveau de la rhizosphère des plantes par suite des petites quantités d'oxygène émises par les racines. Pourtant les sulfato-réducteurs forment des populations nombreuses et variées au contact des racines et profitent, soit de leur tolérance à O_2, soit de conditions anaérobies épisodiques. Là aussi entrent en compétition (ou collaborent éventuellement) des sulfato-réducteurs et des méthanogènes. Dans ces deux catégories existent parallèlement des hydrogénotrophes qui s'emparent de H_2, et des formes dites acétoclastiques qui vivent principalement aux dépens de l'acide acétique. Dans un milieu aussi complexe que le sol, différents accepteurs sont d'emblée disponibles pour une respiration anaérobie (nitrate, sulfate, CO_2...). Il s'établit nécessairement une hiérarchie entre espèces en fonction de l'importance des ressources énergétiques, mais les rapports sont variables dans le temps. Ainsi le nitrate, par son potentiel d'oxydoréduction relativement élevé, est en principe consommé en priorité. Les méthanogènes, plus lents et en grande partie tributaires de l'acétate, de l'hydrogène et de CO_2, n'entrent en scène que plus tardivement. De nombreuses tentatives ont été faites pour reproduire au laboratoire les conditions naturelles. Les graphiques de la page suivante sont tirés de travaux du groupe allemand de CONRAD **[17]**. Les mesures ont porté sur un échantillon de sol.

Les premiers constituants à disparaître sont les nitrates et les nitrites (en moins de 48 h), puis le sulfate. La vague d'acétate est le résultat du travail des acétogènes et des sulfato-réducteurs, mais leur activité se double de celle des organismes fermenteurs qui en produisent aussi, en y ajoutant du propionate, de l'hydrogène et du gaz carbonique. Les auteurs cités ont montré aussi que Fe(III), qui est aussi un accepteur respiratoire, disparaît au profit Fe(II) à peu près à la même vitesse que le sulfate. Mais le principal résultat de cette étude a été de montrer que l'un des effets des organismes réducteurs du nitrate, du fer et du sulfate est de retarder les fermentations et de contrecarrer la méthanogénèse. Ils détournent l'acétate vers la production de CO_2, consomment les premiers le glucose présent dans le sol [5], mais libèrent éventuellement des produits toxiques comme du nitrite, NO ou N_2O.

---

5 - Abondant dans le sol de rizière à partir de la cellulose des débris végétaux.





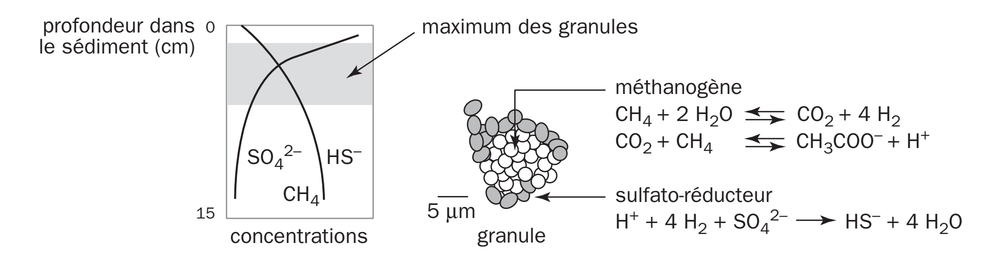
Evolution d'un sol anaérobie au cours du temps

Voici une association assez curieuse qui s'effectue en anaérobiose entre archaebactéries et des bactéries du genre *Beggiatoa*. Celles-ci se comportent en méthanotrophes en l'absence d'oxygène, ce qui peut paraître totalement paradoxal, d'autant plus que ce type de bactérie se rencontre plutôt dans les milieux aérobies où s'effectue l'oxydation du sulfure. La situation inédite a été découverte au large de l'Oregon à une profondeur de 600-800 m au-dessus d'une faille d'origine tectonique d'où se produit un dégagement continuel de méthane **[18]**. Le sédiment océanique est tapissé de *Beggiatoa* formant des agrégats avec des organismes identifiés comme méthanogènes par des techniques utilisant des sondes nucléiques fluorescentes. Là où s'entassent ces agrégats se produit une intense réduction de sulfate en sulfure, comme si les *Beggiatoa* fonctionnaient en sens inverse de leur activité normale. Ni agrégats ni réduction du sulfate n'étaient visibles dans les régions dépourvues de méthane. Force fut de constater que les bactéries oxydaient le méthane selon la réaction globale :

$$CH_4 + SO_4^{2-} \longrightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O$$

L'énergie libre de cette réaction ramenée aux conditions du fond de la mer, et en tenant compte de la concentration du méthane, est estimée à $\Delta G = -30$ kJ par mole de méthane. Le bilan énergétique est donc positif. Le bicarbonate produit à partir du méthane précipite sous forme d'épais dépôts de calcaire. L'emploi du méthane comme source carbonée est prouvée par le déficit du calcaire en ^{13}C sur le ^{12}C, un effet connu comme la signature d'une méthanogénèse. On retrouvait ce caractère dans un certain nombre d'hydrocarbures des sédiments et dans les acides gras bactériens. Les granules étaient de taille très variable et les *Beggiatoa* présumées entouraient étroitement les bactéries du méthane dans un rapport peu différent de 1/1. L'emploi du méthane comme substrat de croissance et d'énergie en l'absence d'oxygène va à l'encontre des schémas classiques. La physiologie de

cette association reste à déterminer avec précision, mais l'hypothèse la plus plausible fait appel :
- à une oxydation du méthane par le sulfate,
- à une réaction inverse de la méthanogénèse formant de l'acétate avec libération simultanée de H_2. Le principe est expliqué par le schéma.



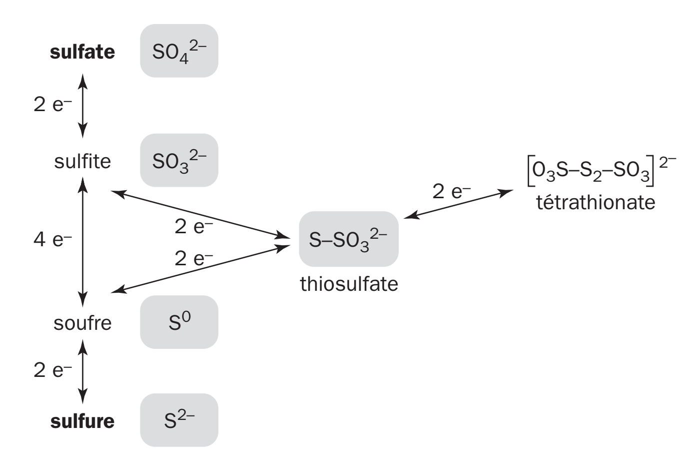
Le diagramme montre la décroissance du taux de sulfate, l'augmentation conjointe du sulfure et du méthane quand on s'enfonce dans le sédiment. Le taux de sulfure à plus de 15 cm de la surface peut atteindre des valeurs élevées proches de 20 mM (l'eau de mer est environ 28 mM en sulfate). Le méthane y atteint 6 mM. Les granules se développent surtout dans la zone où se croisent les deux courbes. Il n'y a pour ainsi dire pas de granules en l'absence de sulfate. À droite est représentée l'interprétation. Le méthanogène fait de l'hydrogène par méthanogénèse inverse (la ligne du haut), opération possible si l'hydrogène est consommé au fur et à mesure par les bactéries qui l'oxydent par le sulfate. Même principe pour l'apparition de l'acétate, mais encore non démontrée. Ce type d'association en sédiment marin profond s'annonce déjà comme répandu à de nombreux endroits du globe, partout où des émanations sous-marines de méthane sont abondantes **[19]**.

Les sulfato-réducteurs participent donc activement à un tourbillon de transformations où intervient une microflore variée. Le sulfate continental est produit régulièrement par l'oxydation des sulfures, eux-mêmes libérés par les décompositions de matières animales ou végétales. Le sulfate n'est donc presque jamais absent, les bactéries sulfato-réductrices non plus. Elles actionnent un maillon essentiel du cycle du soufre. La variété remarquable des espèces et des adaptations physiologiques leur permettent de coloniser de nombreux milieux, ce qui est parfois dommage pour nos industries par les corrosions qu'elles provoquent, leur habitude de favoriser la formation de biofilms et de dépôts acides dans les canalisations. Elles ne sont pas étrangères aux émanations malodorantes produites à partir des matières organiques dans les vases et sédiments des rivières et des étangs.

7.3 - BIOCHIMIE DE LA RÉDUCTION DU SULFATE

Les composés soufrés minéraux d'intérêt biologique occupent plusieurs niveaux d'oxydoréduction résumés dans un tableau. Des formes intermédiaires sont le thiosulfate et les polythionates, parmi lesquels seul le tétrathionate a été représenté. Le sulfite est au même niveau que le bisulfite ou sulfite acide HSO_3^{2-}. Le métabi-

sulfite utilisé en œnologie est le terme usuel désignant la poudre blanche obtenue par évaporation de la solution de $NaHSO_3$, et correspond à $Na_2S_2O_5$.



Niveaux d'oxydation du soufre

L'ion thiosulfate comporte deux atomes de soufre très différents. L'un forme un groupe *sulfone*, où le soufre est lié à plusieurs atomes d'oxygène qui sont équivalents par délocalisation électronique (les charges étant réparties entre eux par hybridation). Le second, qui fait figure de satellite, est un sulf**a**ne. Le niveau d'oxydation du premier correspond au sulfite, alors que celui du deuxième est au niveau du soufre élémentaire S^0. Le degré global d'oxydation du soufre dans le thiosulfate est donc intermédiaire. On peut voir aussi que le tétrathionate correspond à deux thiosulfates liés par leur sulfane, et cette liaison supplémentaire correspond à une oxydation à deux électrons.

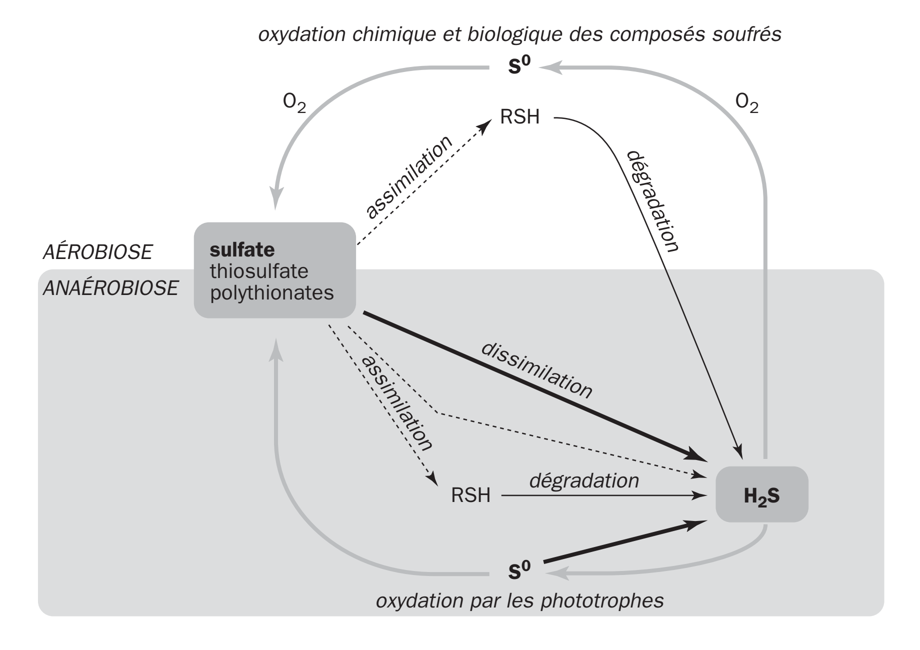
(sulf**a**ne)

Sulfate *Sulfite* *Thiosulfate* *Tétrathionate*

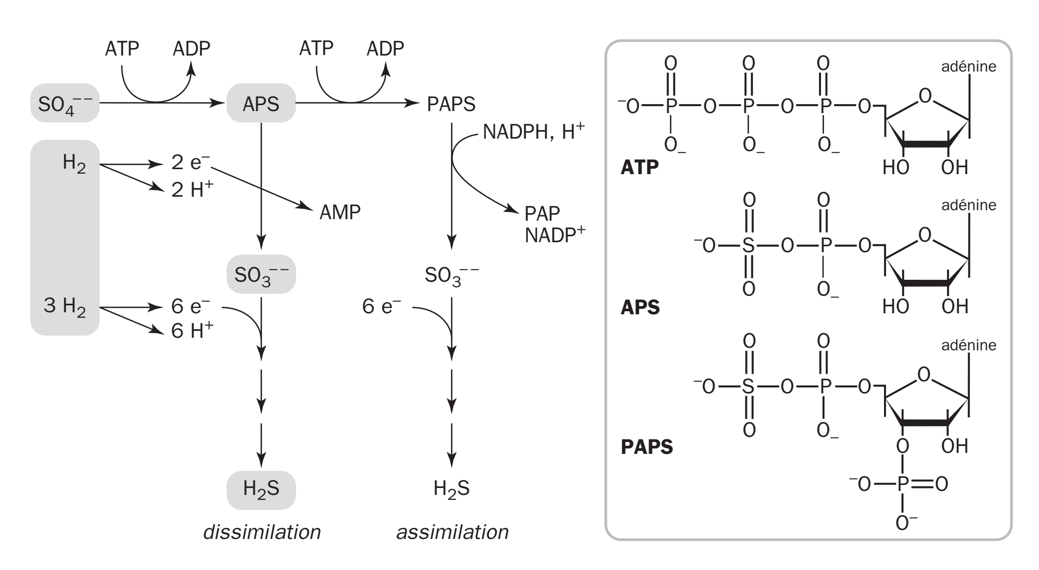
Le tétrathionate fait partie des polythionates au nombre variable d'atomes de soufre sulfane, le plus simple étant le trithionate, où il n'y en a qu'un seul. Chaque oxydoréduction du tableau correspond à un potentiel standard qui servira de point de repère **[20]**. Le cycle du soufre dans la nature fait alterner des phases d'oxydation et de réduction. Il est considéré ici en ne retenant que les étapes les plus importantes. RSH désigne le soufre organique, les flèches noires épaissies soulignent la dissimilation du sulfate et du soufre dont il sera plus particulièrement question ici.

La transformation directe de l'ion sulfate en sulfure nécessite un apport de 8 électrons et comporte au moins 3 étapes, la réduction en hydrosulfite, le passage au soufre élémentaire, puis au sulfure. La plus difficile est la première, parce que le potentiel d'oxydoréduction du couple SO_4^{2-}/HSO_3^{2-} est particulièrement bas

(– 516 mV). Le "bisulfite" est d'ailleurs un réducteur usuel. La transformation du sulfate devrait donc nécessiter l'emploi d'un réducteur très puissant inhabituel en biologie.



La stratégie naturelle consiste à ramener ce potentiel à une valeur plus raisonnable, de l'ordre de – 60 mV, moyennant un apport énergétique représenté par l'ATP. Le sulfate est activé en APS (adénosine-phosphosulfate), ou en PAPS (phospho-adénosine-phosphosulfate), et la réduction porte à leur niveau. L'APS fait partie de la dissimilation du sulfate, tandis que le PAPS intervient de préférence dans son assimilation.



La réduction de l'APS est couplée à l'oxydation de H_2 par une hydrogénase. La première réaction engendre l'APS par l'ATP sulfurylase (EC 2.7.7.4). Le véritable accepteur respiratoire des bactéries sulfato-réductrices est donc l'APS.

La deuxième réaction impliquant l'ATP, catalysée par l'APS kinase, est le départ de la voie assimilatrice qui conduira à l'entrée du soufre dans le métabolisme au niveau de la cystéine. Ce mécanisme n'est pas général dans la nature, car les plantes et les algues s'approvisionnent en soufre à partir du sulfate sans faire le crochet par le PAPS, mais réduisent directement l'APS à l'aide du glutathion comme source d'électrons **[21]**, une particularité du monde végétal que nous laisserons de côté.

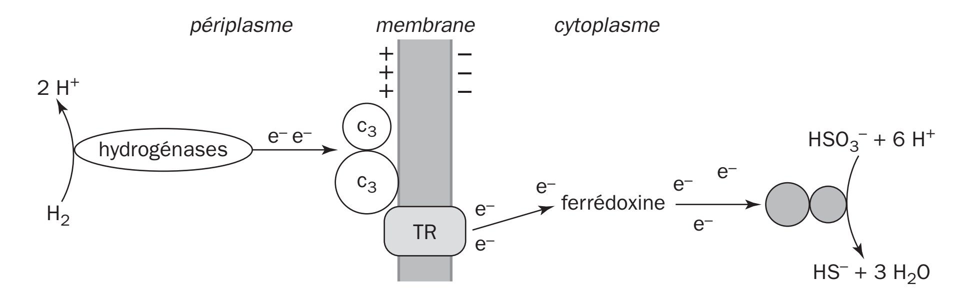
Le passage du sulfite au soufre élémentaire nécessite 6 électrons par mole. La sulfite réductase catalyse d'un seul coup cette oxydoréduction. Il en existe deux formes, selon qu'il s'agit d'une assimilation ou d'une dissimilation à vocation énergétique. Dans la réduction dissimilatrice du sulfite observée dans la respiration sur sulfate, le saut de potentiel est remplacé par un potentiel électrochimique membranaire (Δp). La réductase associée à la membrane a été caractérisée chez une archaebactérie (*Archaeoglobus fulgidus*) **[22]** et plusieurs protéobactéries **[23]**. On lui a donné plusieurs noms sur des bases spectroscopiques : désulfoviridine (*Desulfovibrio vulgaris*), désulforubidine (*Desulfovibrio desulfuricans*), désulfofuscidine (*Thermodesulfovibrio yellowstonii*). Dans leur structure du type $\alpha_2\beta_2$ ou $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, les sous-unités α sont flaviniques, tandis que les β sont munies de noyaux fer-soufre et de *sirohèmes**. Séquences et structure détaillée **[24]** montrent que toutes ces protéines correspondent à une super-famille structurale englobant aussi les réductases assimilatrices des bactéries et des plantes, ainsi que d'autres enzymes catalysant la réaction inverse dans *Thiobacillus*, *Clostridium pasteurianum* et des phototrophes comme *Chromatium vinosum*.

Dans le fonctionnement de la sulfite réductase, la partie flavinique amène les électrons sur le tandem [4Fe-4S]-sirohème. Le soufre du substrat SO_3^{2-} se lie axialement au sirohème sur le fer(II), et reste à cette position au cours des réductions successives. Des coupures réductrices à 2 électrons rompent successivement les 3 liaisons S–O, puis en dernier lieu libèrent le sulfure. Les atomes d'oxygène sont éliminés sous forme d'hydroxyle **[25]**.

Les sulfato-réducteurs montrent une variété intéressante d'enzymes d'oxydoréduction associées à d'autres constituants cellulaires par l'intermédiaire d'une palette de transporteurs non héminiques (ferrédoxines, rubrédoxines, rubrérythrines) ou héminiques (cytochromes). La nature et le nombre de ces composants sont variables d'une espèce à l'autre. Les réductases assimilatrices sont les mieux connues car elles sont solubles et un peu plus simples **[26]**. Le motif essentiel à l'activité de transfert des six électrons est l'association [4Fe-4S]-sirohème. Une sulfite réductase monomérique plus petite de *Desulfovibrio vulgaris* fonctionne aussi comme nitrite réductase et ressemble à des enzymes trouvées chez des archaebactéries. Cette pléthore de protéines polyvalentes permet sans doute une

adaptation aux multiples cas de figure rencontrés par ces organismes. Les réductases se seraient diversifiées à partir d'un modèle commun plus ancien que la séparation des archaebactéries et des autres procaryotes [27].

Les sulfato-réducteurs tirent leur énergie de l'oxydation de différents substrats par le sulfate et le sulfite. Un des substrats les plus courants est l'hydrogène. Son emploi comme donneur d'électrons fait appel à une hydrogénase couplée avec un système accepteur par cytochromes interposés. La sulfite réductase est l'un de ces accepteurs. Le lien s'effectue par cytochromes c_3. Les bactéries du genre *Desulfovibrio* ont plusieurs hydrogénases, et plusieurs cytochromes c. Il est probable que la multiplicité de tous ces intermédiaires correspond à tout un éventail d'adaptations particulières. Voici un schéma de principe, où on peut voir que l'hydrogène est utilisé du côté périplasmique, alors que la sulfite réductase est dans le compartiment opposé. Les transporteurs respiratoires de la membrane sont désignés par TR.



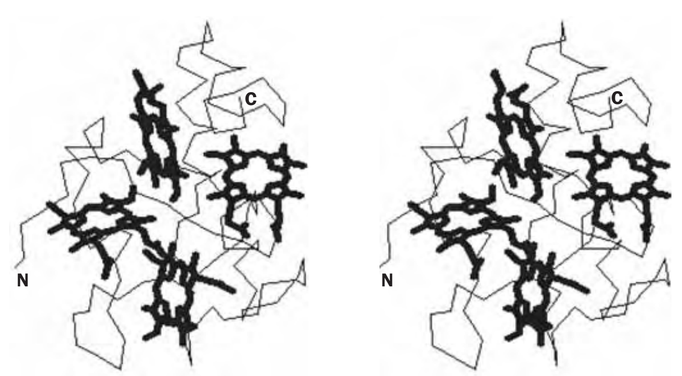
Hydrogénases et potentiel membranaire

L'examen du dispositif permet de voir deux actions susceptibles de favoriser l'apparition d'un potentiel membranaire. Les hydrogénases situées dans l'espace périplasmique scindent l'hydrogène en libérant des protons. Inversement la sulfite réductase sévissant du côté cytoplasmique en consomme. Il y a donc un excédent de charges positives d'un côté et de charges négatives de l'autre. Ce déséquilibre permet en soi une récupération d'énergie à partir de l'oxydation de l'hydrogène par le sulfite, et cet effet s'ajoute à la translocation de protons au niveau des transporteurs d'électrons comme le cytochrome bc_1 dans la membrane (TR). Les outils des bactéries du sulfate sont donc à la fois performants et variés.

Des hydrogénases et des cytochromes c font partie des outils utilisés par les bactéries du genre *Desulfovibrio* et autres sulfato-réducteurs. Les hydrogénases ont toutes des noyaux [4Fe-4S] et nous en connaissons les caractéristiques essentielles. Rappelons les trois grandes classes en fonction du contenu métallique : les hydrogénases à fer seul ([**Fe**]), les hydrogénases à fer et nickel (**[NiFe]**), et celles qui ont à la fois du fer, du nickel et du sélénium (**[NiFeSe]**). Chez les sulfato-réducteurs, ces enzymes sont le plus souvent périplasmiques ou associées à la membrane, mais il en existe aussi dans la fraction cytoplasmique [28]. Les **hydrogénases [Fe]** fonctionnent aussi bien dans la production d'hydrogène que dans sa consommation, mais n'existent pas chez tous les sulfato-réducteurs. Les hydrogénases [NiFe] sont présentes chez toutes les espèces de *Desulfovibrio* tandis que

les [NiFeSe] sont un peu moins communes, le nickel étant lié au sélénium de la sélénocystéine. Nous avons vu que leur construction met en jeu une cohorte de gènes et d'enzymes augmentée, lorsqu'il y a du sélénium, par les facteurs nécessaires à formation de la sélénocystéine.

Les **cytochromes c_3** sont assez caractéristiques des sulfato-réducteurs, en particulier du genre *Desulfovibrio*. Ils sont périplasmiques ou soudés à la face interne de la membrane cytoplasmique et récupèrent les électrons de l'hydrogène captés par l'hydrogénase périplasmique. Le fer des différents hèmes est hexa-coordonné. Les cytochromes c_3 périplasmiques à 4 hèmes C (environ 13 kDa) sont invariablement présents dans le genre *Desulfovibrio* et ont un bas potentiel. Malgré de faibles homologies de séquence, ils sont tous bâtis sur le même plan d'organisation structurale, avec des résidus d'histidine de part et d'autre du plan des porphyrines. Les cytochromes c_3 sont nombreux et variés chez les sulfato-réducteurs, qui en contiennent le plus souvent plusieurs, et appartiennent tous à la classe III des *cytochromes c**. Des cytochromes à masse moléculaire plus élevée coexistent avec les précédents dans la majorité des sulfato-réducteurs. Ils correspondent grosso modo à la répétition de la structure des c_3, soit un dimère de 26 kDa avec 8 hèmes et un constituant à 16 hèmes ou **Hmc** (*high molecular weight*). La répartition des cytochromes varie selon les souches. Par exemple *Desulfovibrio desulfuricans* possède à la fois un cytochrome c_3 à 4 hèmes, un c_3 à 8 hèmes et un cc_3 à 16 hèmes. Une autre souche a un cytochrome c_{553} à un seul hème appartenant à la classe I (les ligands du fer sont His et Met), un cc_3 à 8 hèmes et un Hmp à 16 hèmes **[29]**. Les règles structurales communes sont les liens entre hème et protéine par deux atomes de S (liaisons thio-éther avec la cystéine), et chez tous les cytochromes c_3 de la classe III le fer des porphyrines est relié à de l'histidine comme déjà précisé.



Cytochrome c_3 de Desulfovibrio vulgaris (vues stéréoscopiques)

On dispose de la structure détaillée de plusieurs de ces cytochromes **[30]**. Les hèmes sont caractérisés par leurs bas potentiels, qui s'échelonnent dans les c_3 de – 220 à – 370 mV. Comme on peut le voir sur les croquis stéréos, les 4 hèmes sont assez proches les uns des autres mais ne sont pas coplanaires. Un c_3 peut théoriquement stocker 4 électrons quand il est pleinement réduit et sa structure est remarquablement conservée. Le cc_3 détenteur de 8 hèmes (36 kDa) est cons-

titué de deux sous-unités identiques très similaires au c_3 à 13 kDa, liées chez *D. gigas* par deux ponts disulfures **[31]**. Les liaisons covalentes entre hèmes et polypeptide se font toujours par cystéine interposée dans les séquences consensus C-x-x-C-H ou C-x-x-x-x-C-H.

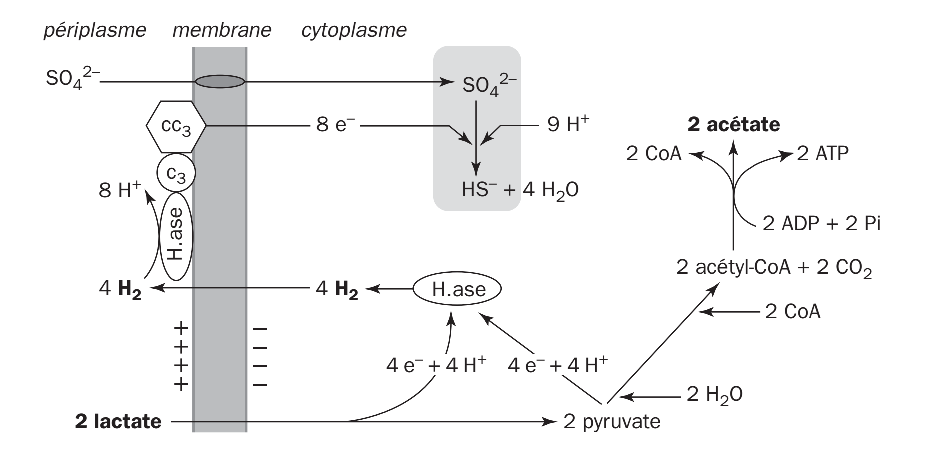
Une question restant sans réponse est la fonction physiologique de cette multiplicité de cytochromes. Ils servent de courroie de transmission à partir des hydrogénases, mais ne se retrouvent pas nécessairement chez les sulfato réducteurs autres que *Desulfovibrio* . On a même douté de l'intervention dans la réduction du sulfate du c_3 à 4 hèmes, le plus petit de la famille. Pourtant il interagit *in vitro* avec une variété de donneurs et d'accepteurs d'électrons. Une application extraordinaire a même été trouvée. Le cytochrome c_3 de *Desulfovibrio vulgaris* est capable de réduire l'uranium(VI) *in vitro* et permet aux bactéries de réduire ce métal en même temps que le sulfate **[32]**, une perspective intéressante pour les décontaminations.

Lorsque le cytochrome c_3 est mobile dans le périplasme, on suppose qu'il transmet les électrons à des cytochromes c de plus grande masse moléculaire et finalement à la sulfite réductase par l'intermédiaire des petites protéines transporteurs d'électrons (ferrédoxines, rubrédoxines et flavodoxines). En amont il y aurait l'hydrogénase et des enzymes qui oxydent le lactate et le pyruvate. *Desulfovibrio desulfuricans* croît avec le sulfate sans source d'hydrogène externe sur l'un ou l'autre de ces substrats. Pourtant cette espèce dispose d'hydrogénases à la fois à l'intérieur et à l'extérieur du cytoplasme. Comment interviennent-elles ? Voici comment peut s'interpréter la situation à l'aide du cycle de l'hydrogène **[33]**. Le schéma montre le couplage de deux processus : la réduction de l'ion sulfate en hydrosulfite, l'oxydation du lactate en acétate et CO_2 avec le pyruvate comme intermédiaire.

$$SO_4^{2-} + 8\,e^- + 9\,H^+ \longrightarrow HS^- + 4\,H_2O$$

$$2\text{ lactate} + 2\,H_2O \longrightarrow 2\text{ acétate} + 2\,CO_2 + 8\,e^- + 8\,H^+$$

$$SO_4^{2-} + 2\text{ lactate} + H^+ \longrightarrow HS^- + 2\text{ acétate} + 2\,CO_2 + 2\,H_2$$



Le métabolisme énergétique des bactéries est censé fonctionner par oxydation du lactate avec le sulfate. Nous constatons d'après ce modèle que l'hydrogène est produit dans le cytoplasme par une première hydrogénase (H.ase), exporté dans le périplasme où il est oxydé à nouveau par une deuxième hydrogénase, les électrons étant récupérés par une chaîne à cytochromes c_3. Ces oxydoréductions s'accompagnent d'un trafic de protons. Il est évident que le cycle comporte un prélèvement de protons à l'intérieur de la cellule, alors qu'il s'en produit à l'extérieur, et conduit à établir une Δp génératrice d'ATP par l'ATP synthase. Mais un ATP supplémentaire est formé à partir de l'acétyl-CoA comme le ferait une fermentation. La cellule fait donc son ATP par deux voies différentes. Elle est armée pour subvenir à ses besoins carbonés, soit en détournant un peu de pyruvate ou d'acétate pour ses synthèses, soit en consommant d'autres molécules carbonées, et c'est bien ce qu'on espère les voir faire quand on leur demande d'attaquer des substances xénobiotiques présentes dans le milieu.

Les hydrogénases et cytochromes c_3 de *D. desulfuricans* donnent lieu à des observations curieuses. En supprimant par mutation la production de telle ou telle hydrogénase, la croissance des bactéries s'en ressent mais n'est pas abolie. Même observation après abolition du cytochrome c_3 à 4 hèmes **[34]**. Dans ce dernier cas, les bactéries continuent à croître presque normalement sur sulfate et lactate. Leur développement est cependant contrarié lorsqu'on remplace le lactate par le pyruvate, ce qui est surprenant puisque celui-ci est un produit d'oxydation du premier. De l'hydrogène est produit mais n'est pas recyclé. Le c_3 serait davantage nécessaire à la croissance sur pyruvate que sur lactate, et le modèle du schéma est sans doute trop simple pour expliquer les faits. On a l'impression que les hydrogénases et cytochromes forment plusieurs circuits capables de fonctionner simultanément ou en remplacement les uns des autres, et ceci ne fait qu'augmenter l'intérêt porté à ces étranges bactéries.

Le **soufre élémentaire** (S^0) n'apparaît pas au cours de la réduction du sulfate. Il est cependant déversé localement dans l'environnement par l'activité volcanique. Il donne lieu à une respiration sur soufre. Deux sortes d'organismes l'utilisent, selon que le soufre est l'accepteur obligé ou non. Les *Desulforomonas* font partie du premier cas et se servent obligatoirement du soufre. Ce sont les **bactéries sulfo-réductrices**. Exemples : *Desulfuromonas acetoxidans*, *D. succinoxidans*, qui oxydent l'acétate ou le succinate jusqu'au CO_2. L'exigence en soufre comme accepteur n'est pourtant pas absolue, car il est parfois remplaçable par du fumarate ou du malate, au moins chez une espèce marine **[35]**. La deuxième catégorie de germes englobe les réducteurs facultatifs du soufre. Celui-ci n'est utilisé qu'en absence de sulfate, de sulfite ou de nitrate. La réduction du soufre élémentaire est commune parmi les archaebactéries, en particulier chez les **méthanogènes**. Ils sont généralement de mauvais utilisateurs de sulfate, mais ils métabolisent souvent le soufre, quelquefois le thiosulfate ou le sulfite. Les méthanogènes en culture arrivent à faire une dissimilation active de S^0 en présence d'hydrogène, jusqu'à rejeter des quantités considérables de sulfure pouvant dépasser 5 mM. *Methanosarcina barkeri* présente une sulfite réductase assimilatrice à faible masse moléculaire ou P590, renfermant un sirohème et un centre fer-soufre, assez analogue à la sulfite réductase de *Desulfuromonas acetoxidans* **[36]**. Une autre enzyme célèbre est la ***rhodanèse**** qui

existe chez les méthanogènes comme *Methanobacterium thermoautotrophicum* **[37]**. La rhodanèse est une transférase qui scinde le thiosulfate pour céder du soufre à un accepteur désigné par A, dans $S_2O_3^{2-} + A^- \rightarrow SO_3^{2-} + AS^-$.

La respiration sur soufre est également commune, voire obligatoire, parmi les archaebactéries thermophiles et thermophiles extrêmes, isolées de sources volcaniques riches en soufre colloïdal et en composés réduits du soufre. Ainsi les *Sulfolobus* sont des archaebactéries strictement anaérobies et tout à fait remarquables. Elles se développent entre 55 et 87°C avec un optimum entre 70 et 80°C, supportent un pH particulièrement acide (de 1 à 5,9), l'optimum étant 2,5. Le soufre est indispensable à leur croissance. Elles s'en servent en autotrophie comme accepteur respiratoire en présence de H_2 aussi bien qu'en hétérotrophie. *Desulfurolobus ambivalens* est un autre organisme du même type à la fois thermophile et acidophile, isolé dans les solfatares d'Islande et poussant entre 70 et 87°. Il n'est pas hétérotrophe et supporte O_2 à la différence de *Sulfolobus*, renfermant alors une oxygénase/réductase spéciale **[38]** qui fabrique simultanément du sulfite, du thiosulfate et H_2S à partir du soufre.

Tout comme les *Desulfovibrio* rencontrés antérieurement, *Desulfuromonas acetoxidans* possède au moins une hydrogénase [NiFe] dans son périplasme **[39]** On y rencontre aussi divers cytochromes, dont le **cytochrome c_7**, appelé aussi cytochrome $c_{551.1}$. Il ne fait que 9,1 kDa avec 68 acides aminés et contient 3 hèmes. Séquence et structure révèlent qu'il ressemble à un cytochrome c_3 qui aurait perdu un segment d'une vingtaine d'acides aminés et un de ses 4 hèmes **[40]**. Le potentiel des hèmes est de – 102 mV pour l'un et – 177 mV pour les autres. D'autres cytochromes renferment respectivement 1,4 et 8 hèmes avec toute une gamme de potentiels, comme chez les bactéries réductrices du sulfate. On répertorie sans cesse de nouvelles espèces vivant de la réduction du soufre près des sources chaudes et des solfatares. Ces bactéries sont fréquemment des thermophiles et adoptent une biochimie particulière. Leur importance dans les biodégradations de la planète est sans doute moindre que celle des sulfato-réductrices les plus communes, car elles vivent dans des biotopes spécialisés et peu répandus en proportion. Elles apportent cependant des renseignements précieux en biochimie fondamentale. D'autre part les thermophiles sont recherchés pour des applications biotechnologiques et la préparation d'enzymes stables à la chaleur.

7.4 - LE FER ET LE MANGANÈSE COMME ACCEPTEURS ANAÉROBIES

Les oxydes de fer et de manganèse font partie des accepteurs respiratoires de la biosphère. Le potentiel standard du couple Fe^{3+}/Fe^{2+} est +770 mV, plus élevé que celui du couple nitrate/nitrite. Celle du couple MnO_2/Mn^{2+} est de l'ordre de + 380 mV à pH neutre. Ce sont des valeurs très théoriques néanmoins, car la plus grande partie du métal est chaque fois sous forme d'oxydes insolubles dans des conditions très éloignées de l'état standard.

Malgré cela les oxydes de Fe(III) et de Mn(IV) fonctionnent comme accepteurs respiratoires dans la nature. On croyait initialement que la réduction du fer et du manganèse dans les sols et sédiments étaient d'origine spontanée. Il a fallu réaliser que les micro-organismes avaient là une fonction essentielle dans des environnements variés et pouvaient même participer à la dépollution au même titre que les dénitrifiants **[41]**. La liste des accepteurs s'est même allongée avec le chromate, l'arsenic, le cobalt, le séléniate et l'uranium, que nous laisserons de côté ici.

La réduction du fer et du manganèse libère des ions Fe^{2+} et Mn^{2+} sous forme de sels beaucoup plus solubles que les oxydes de départ. Elle mobilise ces métaux, qui sont alors facilement entraînés dans les eaux circulantes, parviennent aux rivières où ils subissent une oxydation secondaire. Le phénomène observé est une dissimilation productrice d'énergie, en superposition avec l'assimilation proprement dite, qui consiste à incorporer le métal dans des molécules biologiques telles que les cytochromes pour le fer et le photosystème 2 de la photosynthèse pour le manganèse. Nous ne retiendrons que le volet dissimilation. La compétition vitale étant sévère, les bactéries ont intérêt à utiliser un accepteur doté d'un potentiel favorable et suffisamment abondant. Le type de respiration est choisi en fonction de l'arsenal enzymatique disponible, lui-même réglé au niveau de l'expression des gènes. Les bactéries qui respirent en anaérobiose ont généralement la possibilité de s'adapter à plusieurs accepteurs, et sont donc le siège de mécanismes régulateurs perfectionnés dont l'illustration nous a été donnée par la dénitrification. Les germes vont donc se répartir dans les sols en zones successives. Plus près de la surface peut se dérouler la dénitrification, qui n'est pas trop sensible à la présence de faibles quantités d'oxygène. À l'opposé se situent les méthanogènes, dont la phobie pour l'oxygène est totale. Les bactéries qui réduisent le fer ou le sulfate sont entre les deux. Cette zonation fait penser à une grande ville, où on voit souvent les habitants se répartir inégalement en fonction de critères basés sur les revenus, le prix des loyers et les habitudes culturelles, ce qui les amène à vivre dans différents quartiers ayant chacun une individualité, non sans des interpénétrations. C'est ce que l'on observe dans les sols où il n'y a pas de limites tranchées entre les différentes zones, mais plutôt des niveaux séparés par des transitions progressives. Ces niveaux sont fluctuants en fonction des conditions locales, du taux d'azote, de l'afflux des matières organiques et de la texture des sédiments. Une autre cause de variabilité est l'abondance du sulfate qui est forte dans les sédiments marins, beaucoup plus faible voire marginale en milieu lacustre ou terrestre. Des interférences avec l'humus du sol sont possibles et même probables. Dans les conditions où le fer est biologiquement réduit, les quinones humiques peuvent également fonctionner comme accepteurs et leur action vient se superposer à celle de Fe(III) **[42]**.

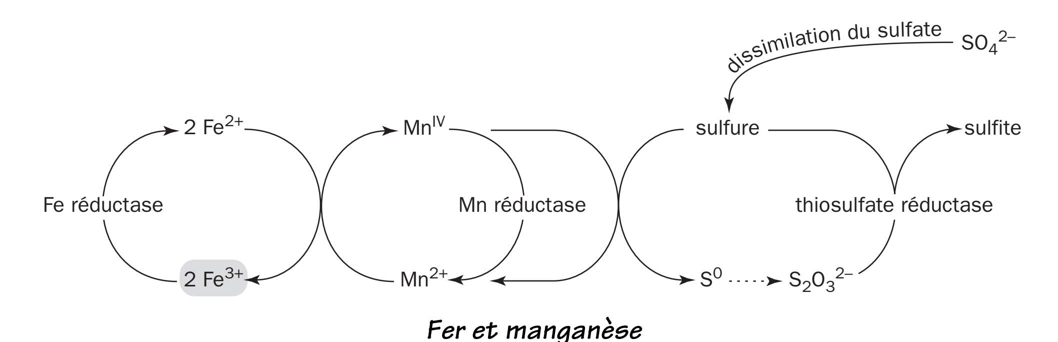
Les études reposent sur la détermination des concentrations métalliques en phase soluble. La mesure se fait couramment par spectroscopie d'absorption atomique. La gamme de détection est de l'ordre de 10-100 $\mu g \cdot L^{-1}$, mais peut s'abaisser à 1 µg avec des perfectionnements techniques ou par spectroscopie d'émission de plasma. Le fer ferreux est dosé colorimétriquement par complexation avec le ferrozine ou la 1,10-phénanthroline. Les dosages de fer ferreux nécessite évidemment des précautions pour éviter sa réoxydation, qui est très rapide en présence de dioxygène.

L'isolement des premières souches bactériennes montrant clairement la dissimilation des oxydes métalliques a été une grande percée sur le sujet. Il revient à des auteurs russes d'avoir attiré l'attention les premiers sur une bactérie du type *Pseudomonas*, qui réduisait Fe^{3+} avec H_2 en absence d'oxygène et de nitrate **[43]**. Après une série d'études, ces bactéries ont été rebaptisées *Shewanella frigidimarina* **[44]**. La réduction des oxydes du manganèse a été démontrée par MYERS et NEALSON **[45]** dans un *Geobacter metallireducens*. Il a été vite réalisé que des bactéries réductrices du fer et du manganèse existaient dans des environnements variés, et pouvaient abonder aussi bien dans les sédiments lacustres que dans les fonds marins comme ceux de la Mer Noire ou de la Baltique.

Les bactéries étudiées montrent une grande souplesse dans l'utilisation des accepteurs. Les espèces du groupe *Shewanella* peuvent vivre en aérobiose. En absence d'O_2, elles peuvent se rabattre sur Fe(III), Mn(IV), oxyde d'uranium U(VI), nitrate, nitrite, thiosulfate, soufre élémentaire, triméthylamine, diméthyl sulfoxyde, et fumarate ! Un éventail presque inégalé. *Geobacter* est strictement anaérobie, mais peut aussi utiliser le Fe(III), le Mn(IV) et le nitrate. Il a été démontré que *Geobacter metallireducens* pouvait effectuer une respiration sur nitrate dans un milieu pauvre en fer pourvu que celui-ci soit présent **[46]**. La respiration sur fer n'est donc pas incompatible avec l'emploi d'autres accepteurs. La respiration anaérobie sur oxyde métallique est directement démontrable. Les bactéries cultivées sur fumarate sont lavées et resuspendues dans un tampon dilué sous atmosphère inerte (N_2), puis mise en présence de fumarate, de fer ou manganèse. La petite acidification qui en résulte chaque fois est enregistrée par un pH-mètre sensible et indique l'expulsion de protons par les bactéries, donc la formation d'une Δp. L'inhibition du phénomène par un agent découplant permet de confirmer cette conclusion. Les *Shewanella* oxydent des substrats carbonés variés : lactate, pyruvate, acides aminés, ainsi que divers composés aromatiques (phénol, toluène, férulate). L'acétate est utilisé en aérobiose, le formiate en anaérobiose seulement. Autre substrat oxydé : l'hydrogène **[47]**. *Geobacter* peut utiliser en anaérobiose l'acétate, qui est visiblement un grand carrefour chimique des cycles naturels.

La liste des souches bactériennes capables de faire la dissimilation du fer ou du manganèse ne cesse de s'allonger. Des sulfato-réducteurs du type *Desulfovibrio* en font partie **[48]**. Les recherches restent encore peu avancées dans ce domaine, mais on en attend beaucoup à cause de la possibilité offerte de coupler la réduction des oxydes métalliques avec la biodégradation de substances polluantes. On s'aperçoit en somme que les bactéries compétentes appartiennent aux groupes taxonomiques les plus variés, anaérobies facultatives ou strictes selon les cas, et généralement dotées d'un grand pouvoir d'adaptation. Des *Vibrio*, *Clostridium* et *Bacillus* peuvent faire ces réductions, mais savent mener en parallèle des réactions de fermentation qu'elles vont privilégier ou non en fonction du gain énergétique. Les conditions nécessaires pour cela paraissent assez communément réalisées, en particulier dans tous les milieux anoxiques où se sont déposés les oxydes de fer insolubles. Pour certaines espèces, la réduction d'un sel ferrique améliore la vitesse de croissance, mais reste une source énergétique d'appoint, alors que d'autres comme *Shewanella* peuvent oxyder un substrat organique en n'utilisant que le fer comme accepteur. L'analyse du problème sur le plan expérimental peut s'avérer

compliquée, à la suite des multiples interférences entre constituants en présence. Par exemple le dioxyde de manganèse (MnO_2) est réduit spontanément par les sulfures ou par les ions ferreux. Il y a donc un chassé-croisé d'actions enzymatiques et non enzymatiques, comme le résume ce schéma simplifié :



Fer et manganèse

La figure suggère que les bactéries sulfato-réductrices sont capables de réduire les oxydes de fer et de manganèse de manière indirecte par les ions sulfure ou hydrosulfure produits :

$$MnO_2 + HS^- + 3H^+ \longrightarrow Mn^{2+} + S^0 + 2H_2O$$

Cette opération peut les aider à se débarrasser de l'excédant du sulfure qui est toxique à forte dose, mais c'est la réduction des ions sulfate qui leur apporte l'énergie. Au contraire une espèce telle que *Shewanella frigidimarina* peut se développer en utilisant exclusivement Fe_2O_3 ou MnO_2 comme accepteurs, grâce à des réductases dont il sera question plus loin. La difficulté est donc de doser avec précision les divers intervenants métalliques, d'autant plus que les oxydes Fe_2O_3 et MnO_2 sont insolubles, interagissent avec d'autres éléments métalliques, forment des complexes hydratés plus ou moins hétéroclites avec l'eau. Leur potentiel d'oxydoréduction varie avec le pH, qui tend à augmenter par réduction du manganèse :

$$MnO_2 + 2e^- + 4\,H^+ \longrightarrow Mn^{2+} + 2H_2O$$

Imaginons un afflux de matières organiques ou de produits de fermentation comme l'acétate dans un milieu anoxique riche en oxydes métalliques, mais pauvre en nitrate ou en sulfate. Les bactéries vont effectuer quand même des biodégradations importantes dans ce type de milieu, d'où l'intérêt qu'on porte de plus en plus à cette biologie particulière.

Les spéculations vont bon train sur l'histoire de la vie primitive au cours de l'immense période, peut-être 3 milliards d'années, qui a précédé le Cambrien. Les plus anciennes formes vivantes étaient certainement des procaryotes, et leur mode de vie était anaérobie. L'atmosphère devait contenir outre la vapeur d'eau, HCl, CO, CO_2, N_2, ainsi que du méthane, de l'ammoniac et de l'acide cyanhydrique. Un milieu qui aurait été peu hospitalier pour nous ! Le dioxyde de carbone était produit par le volcanisme, ainsi qu'une partie du méthane. Il régnait des conditions très réductrices. On a donc des raisons de penser que le fer, très abondant, était

essentiellement à l'état ferreux et combiné au soufre. Des hyperthermophiles comme *Thermotoga maritima* ont un métabolisme très fruste du fer et du soufre et sont peut-être des reliques vivantes de formes très primitives qui ont été isolées à Vulcano dans des sédiments marins surchauffés à 80°C. Elles utilisent du glucose et autres sucres comme sources de carbone. Leur ancienneté évolutive est clairement indiquée par les études de séquence d'ARN 16S et les présence de gènes archaebactériens, montrant que le rameau *Thermotoga* s'est individualisé très tôt, avant l'individualisation des eucaryotes. Cette espèce peut se développer anaérobiquement sur Fe(III), un indice montrant qu'un tel métabolisme a pu avoir lieu aux périodes les plus reculées **[49]**.

On voit difficilement comment l'assimilation massive du carbone par les premiers êtres vivants aurait pu se passer de la photosynthèse, et il est tentant de supposer que le fer a fonctionné dans les temps primitifs comme donneur d'électrons. L'idée d'une photosynthèse archaïque non productrice d'oxygène et fondée sur l'oxydation du fer ferreux a été proposée par WALKER **[50]**. La photosynthèse oxygénique ne serait venue qu'ensuite. Des organismes analogues aux cyanobactéries vivaient depuis plus de 3 milliards d'années, et ont produit les stromatolites fossiles. La photosynthèse cyanobactérienne a entraîné ainsi une montée du potentiel redox environnant et un bouleversement adaptatif considérable des organismes vivant au contact de l'atmosphère. Elle a provoqué aussi l'oxydation massive du fer, qui a formé des oxydes insolubles se déposant en couches encore visibles dans certains terrains archéens. Inversement le fer ferrique devenait un accepteur efficace pour les oxydations énergétiques pratiquées chez les êtres non photosynthétiques. Les *Shewanella* et *Geobacter* utiliseraient donc une méthode très ancienne. Incidemment, la montée d'O_2 a probablement favorisé l'éclosion des premiers eucaryotes, de la formation des métazoaires, de l'apparition des animaux. Songeons qu'à la base du Cambrien (570 millions d'années), alors que s'était déjà déroulés les quatre cinquièmes de l'histoire de la vie jusqu'à nos jours, la base de toutes les grandes lignées animales était déjà en place. L'évolution des animaux avait sans doute déjà divergé de celle des plantes un milliard d'années auparavant.

Cette question fascinante provoque une ruée de recherches et de spéculations. En effet la période précambrienne semble avoir connu des bouleversements climatiques à répétition sur des millions d'années, avec des alternances de périodes chaudes et froides accompagnées de fortes oscillations du dioxyde de carbone atmosphérique, du développement des formes vivantes et probablement de nombreuses extinctions. Ce domaine scientifique est stimulé par les préoccupations modernes sur l'effet de serre et la dérive du climat.

Le calcium et le magnésium libérés par l'érosion des silicates ont provoqué la formation de carbonates. En examinant des terrains anciens dans des falaises de Namibie, des chercheurs américains ont supposé que la terre avait été recouverte par les glaces pendant une période de près de 100 millions d'années débutant avant le Cambrien **[51]**, avec un réchauffement consécutif à une accumulation du CO_2 d'origine volcanique, une fonte des glaces et le développement d'une vie intense. Cette la *snow-ball hypothesis* d'une période "boule de neige" (la terre aurait été recouverte de glace jusqu'aux basses latitudes) est encore très discutée.

Il y aurait pour le fer un fractionnement isotopique par les êtres vivants comme pour le carbone. Une mobilisation plus intense du fer puis sa réoxydation en fer ferrique provoque des dépôts d'oxydes. Or le fer libéré des roches ignées a un rapport $^{56}Fe/^{54}Fe$ de l'ordre de 15,7, avec des écarts très faibles, et la même valeur a été trouvée dans les roches lunaires. Il s'agit sans doute d'un rapport fixé au moment de la naissance du système solaire et on tente de le vérifier sur Mars. Le métabolisme bactérien modifie très légèrement ce rapport en faveur du fer-54 **[52]**. Un appauvrissement en fer-56 dans un dépôt sédimentaire traduirait donc une origine biologique. Un enrichissement montrerait au contraire que du fer a été soustrait par l'activité biologique et transporté ailleurs. L'analyse des strates ferrugineuses anciennes semble être révélatrice de cette activité, avec la possibilité de discerner des cycles d'activité biologique plus ou moins grande. L'importance géochimique à la fois actuelle et ancienne des bactéries du fer ne fait pratiquement plus aucun doute.

La réduction du fer par les bactéries serait responsable de la disparition de plus de la moitié des matières organiques dans les sédiments anaérobies. Les espèces compétentes peuvent s'adapter à des sources carbonées variées. On peut donc espérer les utiliser pour le nettoyage des terrains contaminés par les usines et les décharges **[53]**. Il existe inversement des bactéries capables d'oxyder le fer ferreux en fer ferrique, décrites au chapitre 3. Le fer est donc l'objet d'un cycle naturel important, dont nous n'examinons ici qu'une seule facette.

Quelles sont les caractères généraux des diverses bactéries réductrices du fer ? Les espèces cultivées expérimentalement en anaérobiose sur Fe(III) comme accepteur ne représentent qu'un échantillonnage restreint des potentialités réelles dans la nature. Les données restent partielles ou provisoires. La réduction du fer est-elle compatible avec la présence d'O_2 ? En principe non. La réduction est également inhibée par la présence de nitrate ou de nitrite **[54]**. La réduction du fer peut devenir vigoureuse et atteindre 200 µmoles par minutes en ordre de grandeur. Le taux de croissance de *Shewanella frigidimarina* (appelé antérieurement *Shewanella putrefaciens*) est alors aussi élevé que celui d'un organisme dénitrifiant classique cultivé sur nitrate comme *Paracoccus denitrificans*. Ces deux espéces sont anaérobies facultatives, la première étant répandue dans les eaux douces. Quels sont les substrats métabolisés ? Ils sont communément le pyruvate, le lactate, l'acétate, le formiate et le glycérol-3-phosphate **[55]**. L'hydrogène est également une souce d'électrons permettant aux bactéries de se développer en chimiotrophie. Certaines espèces peuvent coupler la réduction du métal avec l'oxydation du benzène, du toluène et d'autres substrats aromatiques comme le phénol et le p-crésol. L'espèce *Shewanella* MR-1 présente une plasticité étonnante. Elle est capable de remplacer O_2 par le N-oxyde (TMAO), le thiosulfate, le dimethylsulfoxide (DMSO), le citrate ferrique, le manganèse(IV) et le nitrate !

La réduction dissimilatrice des métaux est relativement commune dans la nature. En dehors des espèces Gram-négatives citées, elle s'observe également chez divers sulfato-réducteurs (*Desulfovibrio*), et des formes comme *Geobacter metallireducens*. Les bactéries réductrices peuvent s'emparer du fer chélaté par des molécules organiques ou présents dans des minéraux insolubles tels que la

goethite (FeO-OH), des oxydes et hydroxydes. On a découvert des applications intéressantes. *Geobacter sulfurreducens* est une espèce réductrice du fer qui peut coupler l'oxydation de l'hydrogène à la réduction des formes oxydées du technecium-99. Cet élément est un produit de fission de l'uranium, a été répandu pendant les essais nucléaires à l'air libre et à été détecté comme contaminant des eaux, notamment dans les effluents des stations de retraitement . La réduction du Tc(VII) sous forme de TcO_4^- entraîne la formation de Tc(IV) dans l'oxyde TcO_2 très insoluble, qui précipite et se voit immobilisé. Le mécanisme est double. Le technecium est réduit d'une part par l'activité microbienne directe, d'autre part avec le Fe(II) engendré par la réduction du fer ferrique. L'action des bactéries est donc à la fois directe et indirecte.

Quelle est la chaîne de transporteurs d'électrons utilisée par la réduction dissimilatrice du fer ? Elle comporte une ménaquinone, des cytochromes b et c et une Fe(III)-réductase, avec des variations en fonction de l'espèce et des conditions de croissance. Par exemple *S. frigidimarina* carencée en fer perd ses cytochromes c et sa réductase, et les cellules rose-orangé blanchissent. Ces bactéries ont en effet une teneur élevée en cytochromes c, tous dans le périplasme ou liés à la membrane. Une pièce essentielle de la chaîne de réduction du fer chez *S. frigidimarina* est un cytochrome c à 4 hèmes **[56]**, désignée par CymA. Le fer ou le manganèse ne sont généralement pas accepteurs obligatoires. *S. frigidimarina* peut les remplacer par divers produits comme ceux qui ont été énoncés plus haut, et même par le soufre (S^0). Une propriété banale des bactéries réductrices du fer est d'oxyder des constituants de l'humus du sol avec le nitrate ou le fumarate comme accepteur **[57]**. Comment les bactéries peuvent-elles ingérer des oxydes insolubles ? Elles n'ont pas besoin de le faire, et utilisent les oxydes de fer par contact direct. Si elles en sont séparées expérimentalement par une membrane à dialyse, il n'y a pas de réduction. Cela expliquerait pourquoi la réduction du fer semble s'effectuer sur la membrane externe de *Shewanella putrefaciens* MR-1 **[58]**, avec néanmoins une participation de la membrane cytoplasmique au dispositif **[59]**. La membrane externe de *Shewanella* porte une protéine exceptionnelle de 85 kDa (OmcA) purifiée récemment **[60]**. Son gène indique la présence d'une dizaine de noyaux héminiques C à bas potentiel, de – 243 à – 324 mV et elle serait associée à la face externe de la membrane externe, une disposition très rare pour une protéine de ce type chez les Gram-négatifs. Une autre protéine à 10 hèmes, CymA, est localisée dans la membrane interne. Toute une série de 7 gènes concernés par la réduction du fer sont groupés avec celui de OmcA sur un segment d'ADN de 13 kb : *mtrDEF-omcA-mtrCAB*. Il en résulte un véritable arsenal de cytochromes contenant 10 hèmes de type C, tous à bas potentiel, soit dans la membrane externe en plus de OmcA avec MtrF, soit dans le périplasme avec MtrA, MtrD et MtrE. Si on fait le compte des cytochromes à 10 hèmes, en ajoutant celui qui est dans la membrane interne, cela ferait 60 hèmes de type C communiquant avec l'intérieur de la cellule ! Il y a même en plus un cytochrome c plus petit à 4 hèmes comme les c_3 des sulfato-réducteurs. Seules MtrE et MtrB n'appartiennent pas au club des cytochromes c. Le challenge futur sera de déterminer la disposition plus précise de toutes ces protéines, et de voir si elles ne forment pas un complexe multiprotéique.

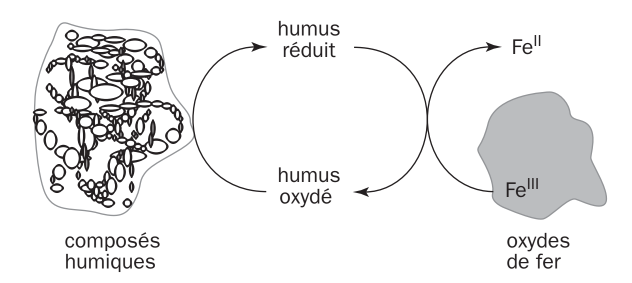
Le fer est peut-être capté par MtrB. Cette protéine associée à la périphérie cellulaire sur la membrane externe est nécessaire à la respiration sur fer **[58]**. Elle n'est pas utile quand les cellules utilisent un autre accepteur d'électrons, par exemple le fumarate. Or l'examen de la séquence révèle une homologie convaincante avec une protéine du colibacille (FepA) qui est un récepteur. Quelle est sa fonction ? Ce récepteur capterait les *sidérophores**, constituants organiques émis dans le milieu et capables de piéger le fer avec une haute affinité. Nous avons donc toutes les pièces qui permettent de se faire une idée du mécanisme de réduction du fer. Les cytochromes présents sur la membrane externe, lorsqu'ils sont réduits, sont réoxydés d'emblée par Fe^{3+}. Il est vraisemblable que la fonction d'OmcA est bien celle d'une fer réductase, recevant le fer de MtrB. Ce dispositif reçoit les électrons à partir de la membrane interne, après avoir été canalysés par un complexe bc_1, un quinol, la protéine à 10 hèmes CymA, puis à travers le périplasme par plusieurs cytochromes jusqu'à la réductase. Le mécanisme a besoin d'être précisé par l'observation de mutants et les analyses biochimiques.

En somme la réductase agit près de la surface bactérienne. Elle reçoit le métal piégé du côté extérieur, et les électrons par une chaîne de transferts venant de la membrane interne par CymA et constituée de nombreux hèmes C. Comme le fer disponible dans la nature en milieu neutre existe généralement sous forme d'oxydes très insolubles, l'existence d'un appareil réducteur à la périphérie de la cellule semble satisfaisante pour l'esprit. L'étrange métabolisme qui consiste à utiliser le fer comme substitut de l'oxygène pour une respiration n'est connu que depuis peu d'années, et l'imprécision des connaissances sur le mécanisme reste frustrante. Peut-on extrapoler ce qui est connu par *Shewanella* à d'autres espèces ? Chez *Geobacter sulfurreductens*, l'enzyme faisant office de réductase est aussi attachée à la surface externe de la membrane externe, et peut s'en libérer facilement sous l'effet d'une solution saline **[61]**. Elle est donc facilement solubilisable sans destruction de la cellule, mais ne peut fonctionner qu'à l'aide d'une source d'électrons. Son activité peut être testée en solution par un apport d'un cytochrome c réduit [6]. Dans certains cas, l'enzyme attachée à la surface cellulaire prendrait livraison du fer apporté par un sidérophore, dans d'autres les cellules viendraient se plaquer sur des particules insolubles d'oxyde et d'hydroxyde de fer. En somme deux tactiques seraient utilisées : entrer directement en contact avec les oxydes de fer ou aller le piéger à distance par des sidérophores et le ramener vers la cellule.

On estime que la réduction du fer dans les sédiments pauvres en oxygène offre une perspective intéressante pour la décontamination des sols pollués par des hydrocarbures ou autres composés organiques. La réduction du fer est stimulée par des agents chélateurs, sans doute en améliorant le contact du métal avec la surface des cellules. On peut s'en rendre compte expérimentalement en imitant la nature chimique de l'humus par le 2,6-anthraquinone-disulfonate (AQDS). Ce produit est réduit en AHQDS (l'hydroquinone) et peut servir lui aussi d'intermédiaire. Il a été observé que l'humus stimulait la destruction des polluants pétroliers en présence d'oxydes de fer.

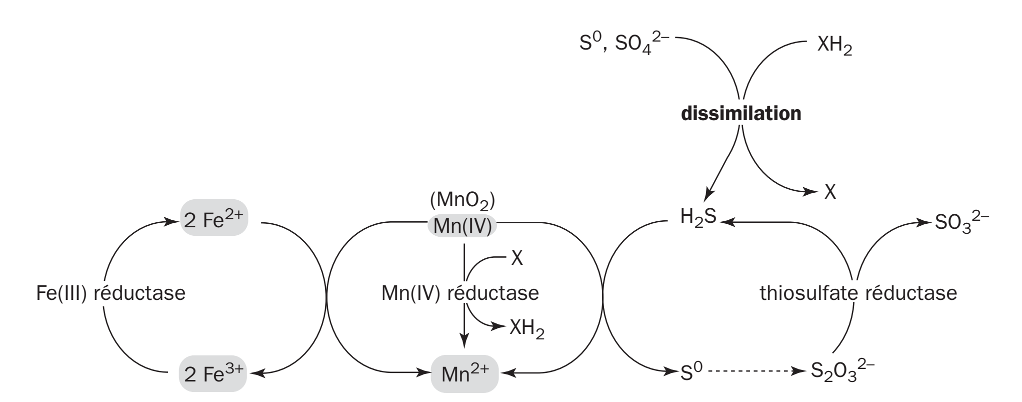
---

6 - *Cytochrome c de cheval, qui est la source commerciale usuelle pour ce genre d'expérience.*



L'humus servirait d'intermédiaire par un cycle où il passerait alternativement d'un état oxydé à un état réduit **[62]**. L'humus oxydé est alors un accepteur respiratoire pour divers germes du sol comme signalé au début de ce chapitre. Il l'est aussi par les réducteurs du fer comme *Shewanella alga* ou *Geobacter metallireducens* qui viennent en contact avec les substances humiques.

L'utilisation du manganèse est-elle calquée sur le même principe ? C'est vraisemblable puisque la réductase du fer chez *Shewanella* réduit aussi Mn(IV). La multiplication des bactéries en flacon fermé contenant du dioxyde de manganèse en suspension dans le milieu s'accompagne d'une disparition spectaculaire de la couleur brune. Le manganèse est un élément abondant de la croûte terrestre dont il représente environ 0,1%. L'altération des roches magmatiques et métamorphiques par les eaux acides le mobilise facilement sous forme d'ions Mn^{2+} soit Mn(II), qui s'oxyde plus ou moins en surface pour donner une grande variété de minéraux (une trentaine !). La rhodochrosite est un carbonate ($MnCO_3$), une forme partiellement oxydée est la manganite ou MnO(OH). La pyrolusite est un dioxyde de manganèse (MnO_2) qui est le plus abondant. Il est formé par l'altération des carbonates et silicates de Mn, et c'est le principal minerai exploité depuis les temps les plus anciens jusqu'à l'époque moderne (industrie du verre, de l'acier et des piles).



Fer, manganèse, sulfate

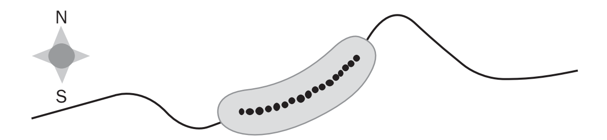
Dans les zones marines où prolifèrent les sulfato-réducteurs, des interactions complexes s'établissent entre le métabolisme des composés soufrés et celui des métaux. Les bactéries sulfato-réductrices des milieux marins apparaissent comme des réducteurs indirects du manganèse et du fer par les sulfures qu'elles

produisent. Le dioxyde de manganèse (MnO_2) est réductible spontanément par Fe(II) et les sulfures (H_2S) comme l'indique la figure inspirée de NEALSON et MYERS **[63]**. On s'explique donc facilement le pouvoir qu'ont les bactéries réductrices du fer d'utiliser parallèlement le dioxyde de manganèse. La source d'électrons est symbolisée par XH_2

Dans de vastes régions des fonds marins existent des sphérules brun-noir ou **nodules** (taille moyenne 4 cm) renfermant avec le manganèse d'autres éléments (fer, quartz, argiles, carbonate…). On pense que la formation de ces nodules pourrait être autocatalytique. L'oxydation de Mn en surface produirait MnO_2 qui faciliterait l'adsorption et l'oxydation de Mn(II) en dioxyde supplémentaire selon un mécanisme qui se perpétuerait de lui-même. Viendraient s'y associer les oxydes de fer. Les particules insolubles iraient se déposer sur le fond en devenant lentement de plus en plus grosses pour former les nodules. Ces derniers résulteraient aussi de l'activité hydrothermale **[64]**. Leur croissance est considérée comme extrêmement lente (1 à 10 mm par million d'années). Le fer de ces nodules présente un léger déficit en fer-56 par rapport au fer-54. Cette déviation du rapport isotopique déjà citée suggère que Fe(III) a été réduit par des bactéries, puis s'est réoxydé à nouveau. Il y aurait donc de fortes chances pour que l'activité biologique ait facilité la formation des nodules. De façon générale l'analyse minéralogique des sédiments marins fournit maintenant de précieux renseignements sur le passé, concernant le climat, la circulation océanique et l'action des êtres vivants. L'examen des nodules apporte des renseignements par les éléments qu'ils incorporent, le rapport isotopique du béryllium et le rapport entre thorium et uranium étant utilisés comme marqueurs de datation. L'exploitation des nodules attire des convoitises par leur aptitude à adsorber d'autres éléments métalliques comme du cuivre, du nickel, du cobalt et autres éléments intéressants. Le manganèse immobilisé sous forme d'oxyde dans le sol et le fond des rivières (birnessite) retient des métaux lourds, des radionuclides (rejets radioactifs). Il oxyde le sélénium(IV) en Se(VI), le chrome(III) en Cr(VI), l'arsenic(III) en As(V). Le dioxyde de manganèse se comporte comme un excellent échangeur de cations aussi efficace que les argiles, en particulier au pH légèrement supérieur à 8 qui est celui de l'eau de mer.

Nous mentionnerons à la fin de cette section le cas étrange des **bactéries magnétotactiques** qui nagent en s'orientant sur le champ magnétique terrestre. Elles ont été découvertes dès 1970 par BLAKEMORE à partir de sédiments d'eau douce **[65]**, et il a fallu constater au cours des années qui ont suivi que ces germes étaient non seulement nombreux dans des localisations précises, mais faciles à isoler. Les cellules mobiles par flagelles se déplacent dans le sens du champ magnétique terrestre, vers le Nord dans l'hémisphère Nord, en sens contraire dans l'autre hémisphère. Leurs mouvements sont observables sous le microscope, et la direction de leur nage est la même pour toutes, à une vitesse de l'ordre de 40 µm à la seconde. L'inversion du champ par l'approche d'un aimant leur fait faire un demi-tour avec un ensemble remarquable. Depuis leur découverte initiale, de nombreuses espèces de bactéries, dites magnétotactiques, ont été trouvées. La première isolée par BLAKEMORE et rebaptisée *Magnetospirillum magnetotacticum* a servi aux études les plus détaillées.

Les cellules réagissent au champ magnétique par la présence dans leur cytoplasme d'un chapelet de minuscules particules de même taille (35 à 120 nm) et constituées par un minéral ferromagnétique, la magnétite Fe_3O_4. Les granules alignés sont entourés d'une membrane commune au sein d'un magnétosome **[66]**. La fonction physiologique de cette membrane n'est pas connue avec certitude. Les grains d'oxyde correspondent à autant de domaines magnétiques individuels qui sont tous orientés dans le même sens dans le magnétosome. Lorsque des grains de magnétite trouvés dans les sédiments ont ces caractères, ils sont suspectés comme étant d'origine biologique.



Aquaspirillum magnetotacticum

Le moment magnétique résultant imprimé par les particules du magnétosome est suffisant pour aligner de façon passive la cellule parallèlement au champ. Aucun autre mécanisme énergétique ne préside à cette orientation. La bactérie nage donc dans la direction qui lui est imposée par l'aimantation de son magnétosome. On a découvert que les magnétosomes ne contenaient pas obligatoirement de la magnétite, qui est remplacée chez des espèces marines par un sulfure équivalent sous forme de greigite (Fe_3S_4), ou encore de pyrrhotite (Fe_7S_8), qui ont aussi des propriétés ferromagnétiques **[67]**. On a reconnu également la présence de pyrite FeS_2, non magnétique. Certains sulfato-réducteurs produisent de la magnétite intracellulaire et forment des sulfures magnétiques extracellulaires **[68]**. Les espèces magnétotactiques déjà répertoriées ne représentent sûrement qu'une petite proportion de la réalité. Une grande variété de formes semble exister. Le magnétisme des sédiments ferrugineux est considéré comme le témoin de l'activité bactérienne à travers les âges et sert de marqueur pour les géophysiciens. La finesse et l'homogénéité des micro-grains de magnétite retiennent l'attention pour diverses biotechnologies.

Dans quels milieux trouve-t-on ces bactéries et quelle interprétation donner à cet étrange comportement ? Elles se concentrent dans les zones où la pression partielle du dioxygène est faible. Dans une mare modérément chargée en matières organiques, la zone favorable peut se trouver à quelques centimètres au-dessus du sédiment. Dans les lacs et étangs, elle peut se trouver à plusieurs mètres du fond. Il y a éventuellement un gradient décroissant de la teneur en oxygène à partir de la surface, et un gradient croissant du taux de sulfure à partir du fond. Enfin elles sont présentes également à grande profondeur dans les océans et dans le sol. Quel est le rôle du champ magnétique dans tout cela ? On observe généralement que l'important n'est pas tellement la direction du nord magnétique que la composante verticale du champ terrestre. Les lignes de forces ne sont pas parallèles à la surface, mais plongent avec une forte déclinaison en direction du nord. La nage en fonction de ces lignes de force est pour les bactéries le moyen de s'enfoncer vers la zone favorable. Le mouvement de ces bactéries pose encore des énigmes non entièrement résolues.

Comment le métal est-il collecté pour confectionner les granules alignés dans le magnétosome ? Le fer du milieu est sous forme d'oxydes ferriques hydratés et insolubles. L'expérience montre que les bactéries réduisent le fer plus ou moins vite en fonction de son état physique. En règle générale les oxydes amorphes sont plus rapidement utilisés que les formes cristallisées. Pour la capture du fer, *Magnetospirillum magnetotacticum* utilise comme les autres Gram-négatives des sidérophores, qui sont ici du type hydroxamate **[69]**. Un mécanisme de transport recueille Fe^{3+} et lui permet de gagner le cytoplasme après réduction partielle en Fe^{2+}. Le détail des opérations reste obscur, mais paraît différent de celui des *Shewanella*. Les bactéries ont une fer réductase à FMN de 36 kDa qui semble utiliser NADH sur la face cytoplasmique de la membrane **[70]**. On ne sait pas si elle fonctionne dans les deux directions : la dissimilation du fer, c'est-à-dire une respiration de sources telles que l'acétate ou l'hydrogène avec le fer comme accepteur, et la synthèse des magnétosomes. La magnétite, Fe_3O_4, correspond à Fe_2O_3 + FeO, soit 2 Fe^{3+} + Fe^{2+}, ce qui implique une réduction partielle du métal [7].

La physiologie métabolique des bactéries magnétotactiques est encore peu documentée malgré des progrès rapides **[71]**. Or l'effet du champ magnétique attire à la fois une vive curiosité et des projets d'applications biotechnologiques. Tenir en laisse avec un aimant des bactéries capables de faire des biodégradations utiles peut sembler une idée attrayante **[72]**. En dehors de ce cas particulier, nous retiendrons le rôle capital des oxydes de fer en milieu anoxique, autorisant l'oxydation respiratoire de divers substrats et venant en complément des autres actions telles que la réduction du nitrate, du sulfate et autres accepteurs. La section suivante nous fera quitter ces accepteurs minéraux et nous dirigera vers d'autres solutions naturelles inédites.

7.5 - DÉSHALOGÉNATION RESPIRATOIRE - OXYDE DE CHLORE

Les composés organiques halogénés sont devenus beaucoup plus abondants autour de nous depuis que l'industrie humaine en déverse dans l'environnement, volontairement ou non. Leur biodégradation est facilitée en aérobiose et nous aurons l'occasion de la décrire. Heureusement, elle s'effectue aussi dans les milieux privés d'oxygène, où cohabitent de nombreuses formes bactériennes qui échangent leurs compétences. C'est en étudiant la dégradation du **3-chlorobenzoate** en milieu anaérobie que DOLFING et TIEDJE ont obtenu une association stable à trois entre un sulfato-réducteur, désigné comme *Desulfomonile tiedjei*, un acétogène et un méthanogène **[73]**. Le premier est normalement capable de pousser en autotrophie sur CO_2 et hydrogène ou formiate. L'accepteur est en principe le sulfate ou le thiosulfate. Il est remplacé ici par le 3-chlorobenzoate :

---

7 - Le mélange de dosage contient un tampon phosphate, NADH, FMN et du citrate ferrique. La réduction du fer est mesurée colorimétriquement à 562 nm par ferrozine.

$$\text{3-chlorobenzoate} + H_2 \longrightarrow \text{benzoate} + \boxed{Cl^-} + H^+ \qquad (1)$$

3-chlorobenzoate benzoate

L'élimination biologique du chlore se fait toujours sous forme d'ion chlorure. Elle équivaut ici à une réduction à 2 électrons. En effet elle est l'inverse d'une substitution électrophile sur le cycle aromatique par une entité cationique, qui serait Cl^+. L'hydrogène apporte les électrons nécessaires pour la réduction en Cl^-. Le résultat est l'oxydation de l'hydrogène par le 3-chlorobenzoate jouant le rôle d'accepteur et une production d'énergie.

Le deuxième partenaire de l'association est un acétogène désigné par BZ-2. Il utilise le benzoate produit par la première souche pour en faire de l'acétate par une réaction de fermentation, elle aussi productrice d'énergie pourvu que la réaction soit tirée vers la droite par la consommation au fur et à mesure de l'acétate et de l'hydrogène.

$$\text{Benzoate}^- + 6\ H_2O \longrightarrow 3\ H_2 + 3\ \text{acétate}^- + 2\ H^+ + CO_2 \qquad (2)$$

Le méthanogène, un *Methanospirillum*, vient parachever les transformations en produisant du méthane, soit à partir de CO_2 + H_2, soit à partir de l'acétate :

$$CO_2 + 4\ H_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O \qquad (3)$$

$$\text{Acétate}^- + H^+ \longrightarrow CH_4 + CO_2 \qquad (4)$$

La première réaction (3) permet d'éponger l'excès de H_2 produit par l'acétogène dans la réaction (2). Les trois réactions (1), (2) et (3) se combinent pour donner le bilan général :

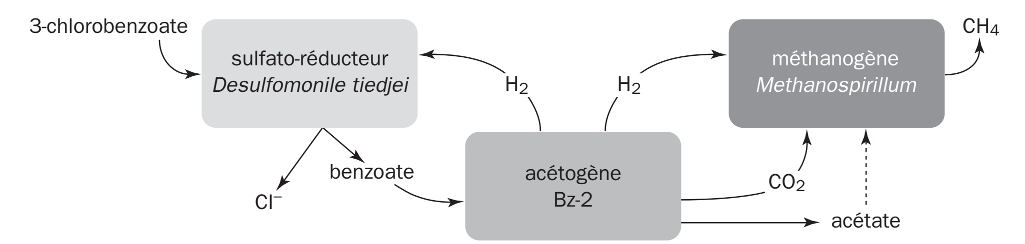
$$2\ (\text{3-Chlorobenzoate}^-) + 10\ H_2O \longrightarrow 6\ \text{acétate}^- + 6\ H^+ + CH_4 + CO_2 + 2\ Cl^- \qquad (5)$$

La réaction (4) est une méthanogénèse acétoclastique. Si elle remplace la réaction (3), H_2 apparaît dans le nouveau bilan :

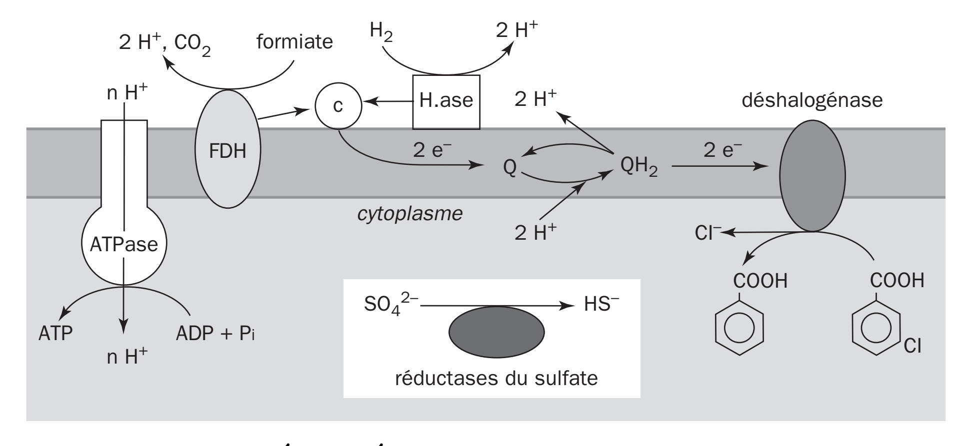
$$2\ (\text{3-chlorobenzoate}^-) + 10\ H_2O \longrightarrow 6\ CH_4 + 6\ CO_2 + 2\ Cl^- + H_2 \qquad (6)$$

Le méthanogène de l'association est essentiellement hydrogénotrophe (il fait son méthane par réduction de CO_2), et les mesures de méthane par chromatographie en phase gazeuse ont vérifié qu'il se formait une molécule d'hydrogène pour 2 molécules de chlorobenzoate consommées par la population mixte. La réaction acétoclastique (4) seule conduirait à un excédant d'hydrogène. Or la souche acétogène BZ-2 ne pourrait pas tirer une énergie suffisante de la réaction (2) si l'hydrogène devenait trop abondant. Toute la communauté en dépend et la concenration d'hydrogène doit rester très faible, inférieure à 40-80 nM. L'hydrogène joue donc un rôle critique dans l'économie générale. Il y a une compétition pour ce gaz entre le *Desulfomonile* et le méthanogène, mais le premier ne peut pas se passer du

second, et vice-versa. L'activité générale du système se maintient grâce à la très forte activité déchlorante de la première souche, seule à produire un flux de benzoate suffisant pour que les deux autres germes puissent se développer. Le schéma résume de façon simplifiée les échanges essentiels entre les trois partenaires de l'association :



Revenons à *D. tiedjei*. Ces bactéries ont donc une déshalogénase dont elles se servent pour réduire le 3-chlorobenzoate avec un substrat simple, comme l'hydrogène ou le formiate. L'enzyme appartient à la membrane cytoplasmique et a été purifiée après solubilisation par un détergent **[74]**, mais on ne peut alors la faire fonctionner qu'avec un donneur d'électrons artificiel comme le méthylviologène réduit, sans doute parce que la chaîne de transporteurs naturels a été rompue. La déshalogénase est colorée en jaune. Elle est composée de deux sous-unités (64 et 37 kDa) et présente les caractères d'une protéine héminique capable de lier CO, avec des propriétés spectrales proches de celles d'un cytochrome c. Les indications expérimentales suggèrent fortement l'intervention de cette déshalogénase comme la pièce inductible essentielle d'une respiration sur 3-chlorobenzoate **[75]**, qui fait partie de ce qu'on appelle une **halorespiration**. Ce processus est inhibé par le HQNO, dépend d'une ménaquinone membranaire, fonctionne concurremment avec la respiration sur sulfate, sulfite ou thiosulfate **[76]**, qui est constitutive chez *D. tiedje*. On a pu relier la déshalogénation du 3-chlorobenzoate à une force proton-motrice Δp, qui serait bâtie essentiellement selon le schéma hypothétique dû à LOUIE et MOHN :



Déshalogénation du 3-chlorobenzoate

Les transferts d'électrons sont simplifiés, et la réduction du sulfate exercée dans le cytoplasme par les réductases (APS réductase et désulfoviridine) est indiquée pour mémoire sans ses connections. Au niveau de la membrane ont été symbolisées :

- l'ATPase/ATP synthase, qui utilise la force protonmotrice pour engendrer de l'ATP (ou inversement qui peut hydrolyser de l'ATP pour produire un Δp) ;
- la formiate déshydrogénase (FDH) ;
- un cytochrome c périplasmique ;
- une hydrogénase (H.ase) ;
- une naphtoquinone respiratoire au sein de la membrane (Q/QH_2) ;
- la déshalogénase.

Le potentiel Δp apparaît essentiellement par l'excédent de protons réalisé du côté périplasmique. L'aller et retour de la quinone entre sa forme oxydée (Q) et sa forme réduite (QH_2) fait partie du **cycle des quinones**, le mécanisme classique qui prélève des protons du côté cytoplasmique pour exporter l'équivalent vers l'extérieur.

La déshalogénation respiratoire d'un halobenzoate est à l'origine de deux surprises intéressantes. La première est de constater que cette propriété est relativement répandue dans la nature. Une déshalogénation a été mise en évidence dans diverses souches, souvent rebaptisées pour la circonstance : *Dehalobacter restrictus*, *Dehalospirillum multivorans* et autres **[77]**. La deuxième surprise est la déshalogénation exercée facilement sur les solvants chlorés auxquels les bactéries n'ont pas été exposées antérieurement, c'est-à-dire le pentachlorophénol (**PCP**), l'hexachlorobenzène, le tétrachloroéthylène, des biphényles polyhalogénés (**PCB**)... Ces déshalogénations anaérobies sont évidemment des plus utiles, mais vont plus ou moins loin selon les souches. Ainsi le tétrachloroéthylène peut être transformé en trichloroéthylène, en dichloroéthylène, et jusqu'au stade chlorure de vinyle. Ces opérations ont un caractère fortuit et seraient dues à la spécificité très large des enzymes de déchloration. L'élimination de l'halogène à partir d'un aromatique se fait en position *méta* pour le chlore, à toutes les positions pour le brome et l'iode.

Nous savons que *D. tiedjei* possède le pouvoir constitutif de réduire le sulfate et autres oxyanions. La présence de plusieurs systèmes respiratoires dans un même germe est peut-être commune. Des régulations permettent d'orienter le métabolisme vers l'accepteur respiratoire le plus avantageux sur le plan énergétique. Comme beaucoup de sulfato-réducteurs, *D. tiedjei* peut réaliser une fermentation du pyruvate en acétate, qui est le seul produit formé en présence de CO_2. Or un cinquième de l'acétate formé dans ces conditions provient du CO_2. L'explication est venue de la découverte d'une CO déshydrogénase (acétyl-CoA synthase) comme celle qu'on trouve chez les acétogènes **[78]**.

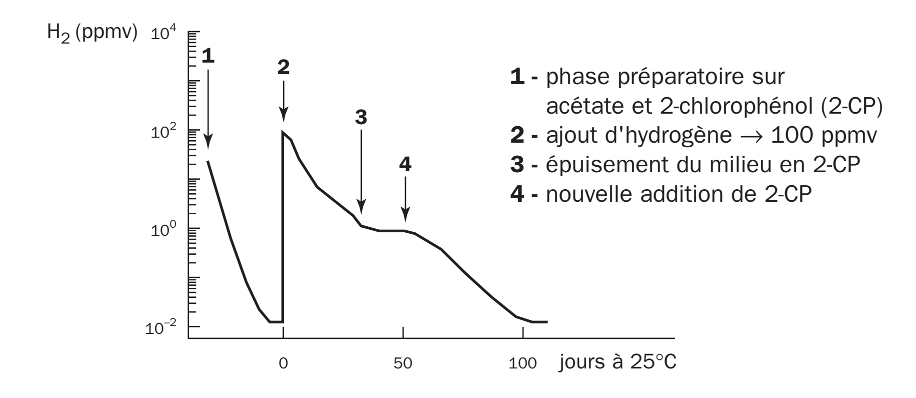
La déchloration de substrats halogénés xénobiotiques offre deux cas de figure. Dans le premier, l'enlèvement de l'halogène est un **cométabolisme** à caractère plus ou moins fortuit : la croissance cellulaire s'appuie alors sur d'autres oxydations. Un exemple typique est la déchloration du tétra-chloroéthylène pratiquée par des sulfato-réducteurs **[79]**, des méthanogènes **[80]** ou des acétogènes **[81]**. La diversité des potentialités déployées par les bactéries présentes dans la vase et sédiments est certainement suffisante pour offrir de nombreuses possibilités de ce genre. Le deuxième cas est celui où les bactéries tirent toute leur énergie de la

déchloration de composés aliphatiques ou aromatiques halogénés faisant office d'accepteurs d'électrons. Comme la croissance des bactéries dépend alors de la déchloration, celle-ci a des chances d'être plus rapide et plus complète. La distinction entre ces deux situations est fondée sur des critères thermodynamiques. Le travail de LÖFFLER et coll. **[82]** fait appel à des cultures anaérobies de plusieurs souches déshalogénantes en utilisant :

- l'acétate comme source de carbone;
- l'hydrogène comme source d'électrons;
- divers dérivés halogénés comme accepteurs. Ce sont le trichloroéthylène, le 1,2-dichloropropane, le chlorure de vinyle et divers phénols chlorés.

L'idée est la suivante. Les électrons émis par la source, qui est H_2, sont utilisés dans deux directions, soit vers le dérivé halogéné fonctionnant comme accepteur pour une part qu'on désignera par Fen (pour énergie), soit vers les synthèses organiques pour une autre part Fsyn, avec Fen + Fsyn = 1. Le potentiel physiologique standard E'° des halodérivés est dans la gamme de + 300 à + 550 mV. Il est beaucoup plus élevé que celui des accepteurs dans l'acétogénèse, la méthanogénèse ou la réduction du sulfate. Le saut énergétique correspondant à l'oxydation de H_2 par le chlorodérivé n'en est donc que plus important. Or la consommation de H_2 écarte celui-ci de l'état standard. En conséquence son potentiel réel E' ne fait que remonter au fur et à mesure que sa concentration diminue, jusqu'à atteindre des valeurs positives quand le taux d'hydrogène est très faible. Si le potentiel de l'hydrogène devient trop élevé, son oxydation par le chlorodérivé devrait s'arrêter. On peut prédire qu'il y a un seuil d'hydrogène au-dessous duquel il n'est plus oxydé. La valeur de ce seuil dépend du potentiel de l'accepteur. Il est plus bas pour un halodérivé, dont le potentiel est relativement élevé, que pour les autres accepteurs.

Le graphique, repris de LÖFFLER et coll., montre la concentration de H_2 au cours du temps dans une culture anaérobie sur acétate et 2-chlorophénol (0,2 mM). Le taux d'hydrogène s'abaisse ef fectivement à des valeurs très basses. En comparant la disparition de H_2, l'accroissement de la biomasse, et la disparition du 2-chlorophénol, il a été possible d'évaluer la part des électrons consacrés à la chlororespiration, soit une fraction Fen de 0,6-0,7. Cette fraction a été trouvée nettement plus faible (0,012) dans une culture mixte méthanogène pratiquant le cométabolisme d'un chlorophénol.



La chlororespiration est donc une réalité intéressante qui permet d'espérer la dépollution efficace de certains dérivés chlorés. Cette possibilité figure actuellement dans de nombreux projets de financement de la recherche. En effet nombreux sont les sites anaérobies contaminés. La déshalogénation réductrice offre de bonnes perspectives pour le nettoyage des aquifères et des sédiments.

COO^- CH_2 Cl OH OH Cl Cl

Cl-OHPA 2,3-dichlorophénol

La découverte de la déshalogénase du 3-chlorobenzoate de *D. tiedjei,* évoquée plus haut, a déclenché des recherches vigoureuses conduisant à la découverte de système bactériens variés s'attaquant, soit à des aromatiques, soit au tétrachloroéthylène (TeCE). Parmi les substrats aromatiques on trouve le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (Cl-OHPA) **[83]**, le penta-chlorophénol **[84]**, le 2,3-dichlorophénol. La déshalogénation la mieux caractérisée est cependant celle du TeCE.

Les déshalogénases sont testées à l'aide d'un colorant accepteur du type viologène. Toutes sont membranaires et présumées fonctionner dans une respiration anaérobie. Chose curieuse, l'enzyme de *D. tiejei* contenant un hème C fait figure de système atypique, parce que toutes les autres qui ont été examinées renferment un cofacteur **corrinoïde**. La déshalogénase réductrice du TeCE a été purifiée à partir d'un *Desulfitobacterium* cultivé sur pyruvate et fumarate **[85]**. L'enzyme monomérique de 65 kDa contient deux noyaux [4Fe-4S] et un corrinoïde sensible à l'inhibition par le cyanure et le sulfite. Des enzymes similaires ont été trouvées chez d'autres espèces. Une seule a été trouvée à l'état soluble (*Dehalospirillum multivorans*) malgré son intervention dans un métabolisme respiratoire **[86]**. Le potentiel du couple TeCE/TCE (trichloroéthylène) est E'° = + 580 mV. Celui du couple TCE/DCE [8] est E'° = + 540 mV. Ces valeurs sont donc fortement positives. Pourtant la déshalogénation requiert un bas potentiel, inférieur à – 360 mV, justifiant probablement la présence du corrinoïde et des centres [4Fe-4S] dont le potentiel est proche de – 480 mV. L'intervention du cobalt permet de faire plusieurs prévisions. Le bas potentiel requis suggère que Co(I) est l'entité réductrice. D'autre part le cobalt doit participer comme dans les autres corrinoïdes à une oxydoréduction entre Co(I) et Co(III), ce dernier pouvant établir une liaison covalente transitoire avec le carbone. Les observations et des considérations théoriques suggèrent que le mécanisme pourrait être radicalaire comme indiqué sur le schéma **[87]** avec les différents états désignés par *base-off* pour Co(I) et *base-on* pour Co(II) et Co(III) définis en glossaire.

---

8 - Dichloroéthylène.

Déshalogénation du tétrachloroéthylène

Les déshalogénases des aromatiques fonctionneraient sur le même principe, mais l'intervention d'un hème dans l'enzyme du 3-chlorobenzoate reste inexpliquée. Des mesures et calculs théoriques ont eu lieu pour comparer l'énergie produite et le rendement de croissance, qui reste faible. La variation d'énergie libre $\Delta G'^0$ de la déchloration du TeCE en dichloroéthylène est de 189 kJ par mole d'hydrogène utilisé comme donneur. La formation d'un ATP en conditions réelles requiert de l'ordre de 70 kJ par mole. Le gradient de protons engendré ne serait que 2 H^+ par mole de H_2, alors qu'il en faudrait au moins 3 pour la synthèse d'une molécule d'ATP. Le rendement médiocre explique la lenteur de croissance de *Dehalospirillum multivorans* et la faible biomasse obtenue. Malgré cela les synthèses fonctionnent tout de même. Dans la nature, on sait parfois vivre petitement.

Nous en arrivons à considérer les **oxydes de chlore**. Leur contamination des milieux aquatiques et du sol est une pollution essentiellement artificielle née de l'emploi des herbicides, du blanchiment des pâtes industrielles papetières obtenues par le *procédé KRAFT**, de l'industrie des carburants pour fusées (perchlorate d'ammonium) et de l'activité des arsenaux militaires, notamment aux Etats-Unis où le problème est devenu préoccupant dans certaines régions. Il s'agit du perchlorate (ClO_4^-), du chlorate (ClO_3^-), du dioxyde de chlore (ClO_2), du chlorite (ClO_2^-), et enfin de l'hypochlorite (ClO^-) popularisé par l'eau de Javel. Le chlorate de sodium reste souvent utilisé comme désherbant total des chemins et voies ferrées, ainsi que pour la destruction des souches. Les sources naturelles de ces oxydes sont sans doute minimes, ne peuvent s'envisager que par l'activité des peroxydases. Tous ces produits sont potentiellement dangereux pour la santé. Le perchlorate affecte la glande thyroïde et provoque des atteintes de la moelle osseuse, le chlorite à faible taux provoque des anémies hémolytiques chez les animaux de laboratoire. Le chlorate mélangé à d'autres matériaux facilement oxydables peut se transformer en explosif, et il est généralement fourni dans le commerce en association avec un autre matériau servant de ballast et destiné à diminuer ce risque.

Le chlore et ses oxydes (ClO_2^-, ClO_2, ClO^-) ont été largement utilisés dans le traitement des eaux. L'hypochlorite de calcium, $Ca(ClO)_2$, vendu en galets, sert à la désinfection des piscines à pH 7,2-7,6. Le chlore injecté dans l'eau engendre de l'hypochlorite par une réaction de dismutation : $Cl_2 + H_2O \rightarrow HCl + HOCl$. Le chlorite de sodium réagit avec l'hypochlorite en milieu acide pour donner du dioxyde de chlore et du NaCl. L'hypochlorite de sodium contenu dans l'eau de Javel donne lieu à une dismutation qui engendre chlorate et NaCl : $3\ NaClO \rightarrow NaClO_3 + 2\ NaCl$. Le chlorure mis à part, ces différents produits sont tous de source artificielle [9], sont susceptibles d'avoir des effets pervers, et se livrent entre eux à des réactions de dismutation. On comprend donc que leur emploi dans le traitement des eaux nécessite une certaine attention. La réduction du chlorate en chlorite par les micro-organismes est commune. La réaction apparaît comme une compétition déjà mentionnée avec la réduction du nitrate par la nitrate réductase. Certaines espèces vont plus loin et utilisent le chlorate ou le perchlorate comme un accepteur d'électrons dans un processus dissimilateur. Citons un *Dechloromonas* souche CKB **[88]**, *Ideonella dechloratans* et *Wolinella succinogenes* **[89]**. Une douzaine de dissimilateurs du chlorate ont été isolés à partir de divers milieux par COATES et coll. **[90]**. L'existence d'une respiration sur chlorate est donc pratiquement certaine.

Ces bactéries sont toutes des protéobactéries α, β et γ, bâtonnets mobiles se comportant en anaérobies facultatifs. Toutes peuvent oxyder totalement l'acétate en présence de chlorate 10 mM :

$$3\ CH_3COO^- + 4\ ClO_3^- + 3\ H^+ \longrightarrow 6\ CO_2 + 4\ Cl^- + 6\ H_2O$$

Quelques-unes étaient aussi des dénitrifiants, mais aucune ne réduisait le sulfate. Divers acides organiques à courte chaîne (propionate, butyrate...) sont oxydés, ainsi parfois que Fe(II). Le glucose et H_2 ne sont pas utilisés comme donneurs. Au cours de la réduction à six électrons du chlorate en chlorure, aucun intermédiaire tel que le chlorite n'est détecté. Ce caractère est peut-être en rapport avec la présence caractéristique d'une **chlorite dismutase**, enzyme transformant le chlorite en chlore et dioxygène. Les auteurs ont noté que la réaction était si puissante en présence de 10 mM de chlorite qu'un dégagement gazeux important se produisait dans une suspension cellulaire. Le chlorite était consommé plus rapidement que le chlorate, ce qui expliquait pourquoi on ne l'avait pas détecté comme intermédiaire. La dismutase purifiée chez *Dechlorimonas*, est un homotétramère de 120 kDa. Le dégagement d'oxygène est en rapport avec la possibilité de vivre en aérobiose, et montre que ces bactéries ne peuvent pas être des anaérobies strictes. Tous ces germes sont incapables de fermenter. Leur métabolisme est donc essentiellement respiratoire, l'accepteur étant O_2, le chlorate, le perchlorate et parfois le nitrate. Sulfate, fumarate et Fe(III) ne sont pas accepteurs. Les cellules contiennent un cytochrome c, mais l'analyse détaillée des transporteurs reste à faire. La réduction du chlorate est une étrangeté. Il s'agit peut-être d'un détournement de l'activité de la nitrate réductase chez les dénitrifiants. Divers organismes, dont *Proteus mirabilis*

---

9 - *A l'exception des quantités minimes d'hypochlorite produites par les polynucléaires neutrophiles au cours du processus inflammatoire, sous la dépendance de la myéloperoxydase.*

et les *Rhodobacter* peuvent réduire le chlorate en chlorite sans pouvoir pour autant utiliser cette capacité pour leur croissance. En outre *P. mirabilis* fait une chlorate réductase spécifique qui n'agit pas sur le nitrate. Parce que le chlorate n'est pas un ingrédient très courant dans la nature, l'origine d'une respiration spécifique du chlorate devrait avoir résulté de l'évolution d'un système pré-existant.

CONCLUSION SOMMAIRE

Les respirations anaérobies sont donc extraordinairement riches et variées dans l'environnement. Elles utilisent comme accepteurs d'électrons des produits du métabolisme (fumarate), les oxydes du soufre et le soufre lui-même, des métaux, et chose étonnante des composés artificiels chlorés. À cela s'ajoutent bien sûr les oxydes de l'azote. Il est possible que beaucoup de systèmes plus ou moins étranges restent à répertorier. Certains métabolismes demeurent inexpliqués. Ils témoignent cependant du formidable pouvoir d'adaptation de la microflore dans son ensemble face à l'apparition de polluants générés par l'homme et de la mise en service de nombreux mécanismes encore incomplètement analysés.

RÉFÉRENCES

[1] MAKLASHINA E, BERTHOLD DK & CECCHINI G (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 5989-5996.

[2] IVERSON TM, LUNA-CHAVEZ C, CECCHINI G & REES DC (1999) *Science* **284** : 1961-1966.

[3] LANCASTER CRD, KRÖGER A, AUER M & MICHEL H (1999) *Nature* **402** : 377-385.

[4] REID GA, MILES CS, MOYSEY RK, PANKHURST KL & CHAPMAN SK (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1459** : 310-315.

[5] ROTHERY RA, TRIEBER CA & WEINER JH (1999) *J. Biol. Chem.* **274** : 13002-13009.

[6] SHAW AL, HOCHKOEPPLER A, BONORA P, ZANNONI P, HANSON GR & MACEWAN AG (1999) *J. Biol. Chem.* **274** : 9911-9914.

[7] CZJZEK M, DOS SANTOS JP, POMMIER J, GIORDANO G, MEJEAN VV & HASER R (1998) *J. Mol. Biol.* **284** : 435-447 ;
JOHNSON KE & RAJAGOPALAN KV (2001) *J. Biol. Chem.* **276** : 13178-13185.

[8] GARTON SD, HILTON JC, OKU H, CROUSE BR, RAJAGOPALAN KV & JOHNSON MK (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119** : 12906-12916.

[9] MÉJEAN V, IOBBI-NIVOL C, LEPELLETIER M, GIORDANO G, CHIPPAUX M & PASCAL MC (1994) *Mol. Microbiol.* **11** : 1169-1179 ;
UJIIYE T, YAMAMOTO I, NAKAMA H, OKUBO A, YAMAZAKI S & SATOH T (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1353** : 1-5 ;
DOS SANTOS JP, IOBBI-NIVOL C, COUILLAULT C, GIORDANO G & MÉJEAN V (1998) *J. Mol. Biol.* **284** : 421-433.

[10] ANSALDI M, JOURLIN-CASTELLI C, LEPELLETIER M, THÉRAULAZ L & MÉJEAN V (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 2691-2695.

[11] SHEN Y, BUICK R, CANFIELD DE (2001) *Nature* **410** : 77-81.

[12] BAK F & PFENNIG N (1991) *FEMS Microbiol.* Ecol. **85** : 43-52.

[13] WIDDEL F (1988) *In "Biology of Anaerobic microorganisms"*, ZEHNDER AJB ed., John Wiley & Sons : **469**-585.

[14] STAHLMANN J & coll. (1991) *Arch. Microbiol.* **155** : 554-558.

[15] LANYI JK (1979) *Biochim. Biophys.* Acta **559** : 377-397.

[16] WIND T, STUBNER S & CONRAD R (1999) *Syst. Appl. Microbiol.* **22** : 269-279.

[17] CHIDTHAISONG A & CONRAD R (2000) *FEMS Microbiol. Ecology* **31** : 73-86.

[18] BOETIUS A & coll. (2000) *Nature* **407** : 623-626.

[19] ORPHAN VJ, HINRICHS K-U, USSLER III W, PAULL CK, TAYLOR LT, SYLVA SP, HAYES JM & DELONG EF (2001*) Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 1922-1934.

[20] BITTERER H, cité par BRUNEDC (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **975** : 189-221.

[21] BICK JA & LEUSTEK C (1998) *Curr. Opinion Plant Biol.* **1** : 240-244.

[22] DAHL C, KREDICH NM, DEUTZMANN R, TRÜPER HG (1993) *J. Gen. Microbiol.* **139** : 1817-1828.

[23] HATCHIKIAN EC & ZEIKUS JG (1983) *J. Bacteriol.* **153** : 1211-1220 ;
ARENDSEN AF, VERHAGEN MFJM, WOLBERT RBG, PIERIK AJ, STAMS AJM, JETTEN MSM & HAGEN WR (1993) *Biochemistry* **32** : 10323-10330.

[24] CRANE BR, SIEGEL LM & GETZOFF ED (1995) *Science* **270** : 59-67.

[25] TAN J & COWAN JA (1991) *Biochemistry* **30** : 8910-8917.

[26] MARRITT MJ & HAGEN WF (1996) *Eur. J. Biochem.* **238** : 724-727 ;
ZEGHOUF M, FONTECAVE M & COVÈS J (2000) *J. Biol. Chem.* **275** : 37651-37656.

[27] WAGNER M, ROGER AJ, FLAX JL, BRUSSEAU GA & STAHL DA (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 2975-2982.

[28] TEIXEIRA M, FAUQUE G, MOURA I, LESPINAT PA, BERLIER Y, PRICKRIL B, PECK HD, XAVIER AV, LE GALL J & MOURA JJ (1987) *Eur. J. Biochem.* **167** : 47-58 ;
TEIXEIRA M, MOURA I, FAUQUE G, DERVARTANIAN DV, LEGALL J, PECK HD, MOURA JJ & HUYNH BH (1990) *Eur. J. Biochem.* **189** : 381-386.

[29] CZJZEK M, GUERLESQUIN F, BRUSCHI M & HASER R (1996) *Structure* **15** : 395-404 ;
AUBERT C, LEROY G, BIANCO P, FOREST E, BRUSCHI M & DOLLA A (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242** : 213-218.

[30] MORAIS J, PALMA PN, FRAZAO C, CALDEIRA J, LEGALL J, MOURA I, MOURA JJ & CARRONDO MA (1995) *Biochemistry* **34** : 12830-12841 ;
BRENNAN L, TURNER DL, MESSIAS AC, TEODORO ML, LEGALL J, SANTOS H & XAVIER AV (2000) *J. Mol. Biol.* **298** : 61-82.

[31] AUBERT C, LEROY G, BRUSCHI M, WALL JD & DOLLA A (1997) *J. Biol. Chem.* **272** : 15128-15134.

[32] LOVLEY DR & PHILLIPS EJP (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 850-856. ;
LOVLEY DR, WIDMAN PK, WOODWARK JC & PHILLIPS EJP (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3572-3576.

[33] PECK HD (1993) *In "Bioenergetic strategies of the sulfate-reducing bacteria",* ODOM JM & SINGLETON R eds, Springer-Verlag, New York : 41-76.

[34] Rapp-Giles BJ, Casalot L, English RS, Ringbauer JA, Dolla A & Wall JD (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 671-677.

[35] Heijthuijsen JHFG & Hansen TA (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 965-969.

[36] Moura I, Lino AR, Moura JJ, Xavier AV, Fauque G, Peck HD & LeGall J (1986) *Biochem Biophys. Res. Commun.* **141** : 1032-1041.

[37] Ideno A, Yoshida T, Furutani M & Maruyama T (2000) *Eur. J. Biochem* **267** : 3139-3149.

[38] Kletzin A (1989) *J.Bacteriol* **171** : 1638-1643 ; Kletzin A (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 5854-5859.

[39] Brugna M, Nitschke W, Toci R, Bruschi M & Guidici-Orticoni M (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 5505-5508.

[40] Banci L, Bertini I, Bruschi M, Sompornpisut P & Turano P (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** : 14396-14400.

[41] Lovley DR (1991) *Microbiol. Rev* **55** : 259-287.

[42] Lovley DR & Blunt-Harris EL (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 4252-4254.

[43] Balashova VV & Zavarzin GA (1980) *Microbiology* **48** : 635-639.

[44] Semple K & Westlake D (1987) *Canad. J. Microbiol.* **33** : 366-371 ; MacDonell MT & Colwell RR (1985) *Syst. Appl. Microbiol.* **6** : 171-182.

[45] Myers CR & Nealson KH (1988) *Science* **240** : 1309-1321.

[46] Senko JM & Stolz JF (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 3750-3752.

[47] Lovley DR (1993) *Annu. Rev. Microbiol.* **47** : 263-290 ; Nealson KH & Saffarini D (1994) *Annu. Rev. Microbiol.* **48** : 311-343.

[48] Coleman MLHedrick DB, Lovley DR, White DC & Pye K (1993) *Nature* **361** :436-438.

[49] Vargas M, Kashefi K, Blunt-Harris EL & Lovley DR (1998) *Nature* **395** : 65-67.

[50] Walker JCG (1987) *Nature* **329** : 710-712.

[51] Hoffman PF, Kaufman AJ, Halverson GP & Schrag DP (1998) *Science* **281** : 1342-1346.

[52] Beard BL, Johnson CM, Cox L, Sun H, Nealson KH & Aguilar C (1999) *Science* **285** : 1889-1892.

[53] Rugge K, Berg PL & Christensen PL (1995) *Environ Sci. Technol.* **29** : 1395-1400.

[54] DiChristina DJ (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 1891-1896.

[55] Lascelles J & Burke K (1978) *J. Bacteriol.* **134** : 585-595 ; Lovley DR, Phillips EJP & Lonergan DJ (1989) *Appl. Environ. Microbiol*. **55** : 700-706.

[56] MyersCR & Myers JM (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 1143-1152.

[57] Lovley DR, Fraga JL, Coates JD & Blunt-Harris EL (1999) *Environ. Microbiol.* **1** : 89-98.

[58] Beliaev AS & Saffarini DA (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 6292-6297.

[59] Myers C & Myers J (1993) FEMS *Microbiol. Lett.* **108** : 15-22.

[60] Field SJ, Dobbin PS, Cheesman MR, Matmough NJ, Thompso AJ & Richardson DJ (2000) *J. Biol. Chem.* **275** : 8515-8522.

[61] Gaspard S, Vasquez F & Holliger C (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 3188-3194.

[62] Lovley DR (1997) *FEMS Microbiol. Reviews* **20** : 305-313.

[63] Nealson KH & C.R. Myers CR (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 439-443.

[64] KASTNER M (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** : 3380-3387.

[65] BLAKEMORE RP (1982) *Annu. Rev. Microbiol.* **36** : 217-238.

[66] BALKWILL DL, MARATEA D & BLAKEMORE RP(1980) *J. Bacteriol.* **141** : 1399-1408.

[67] MANN S, SPARKS NHC, FRANKEL RB, BAZYLINSKI DA & JANNASCH HW (1990) *Nature* **343** : 258-261 ;
FARINA M, MOTTA S, ESQUIVEL S & LINS DE BARROS HGP (1990) *Nature* **343** : 256-258.

[68] SAKAGUCHI T, BURGESS JG & MATSUNAGA T (1993) *Nature* **365** : 47-49.

[69] PAOLETTI LC & BLAKEMORE RP (1986) *J. Bacteriol.* **167** : 73-76 ;
PAOLETTI LC & BLAKEMORE RP (1988) *Curr. Microbiol.* **17** : 339-342.

[70] NOGUCHI Y, FUJIWARA T, YOSHIMATSU K & FUKUMORI Y (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 2142-2147.

[71] SCHÜLER D (1999) *J. Mol. Biotechnol.* **1** : 79-86.

[72] SCHÜLER D & FRANKEL RB (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** : 464-473.

[73] DOLFING J & TIEDJE JM (1991) *FEMS Microbiol.* Ecol. **86** : 25-32.

[74] NI S, FREDERICKSON JK & XUN L (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 5135-5139.

[75] LOUIE TM & MOHN WW (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 40-46.

[76] TOWNSEND GT & SUFLITA JM (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 3594-3599.

[77] SCHOLZ-MURAMATSU H, NEUMANN A, MEBMER M, MOORE E & DIEKERT G (1995) *Arch. Microbiol.* **163** : 48-56 ;
MAYMO-GATELL X, CHIEN YT, GOSSETT JM & ZINDER SH (1997) *Science* **276** : 1568-1571 ;
HOLLIGER C, HAHN D, HARMSEN H, LUDWIG W, SCHUMACHER W, TINDALL B, VASQUEZ F, WEISS N & ZEHNDER AJB (1998) *Arch. Microbiology* **169** : 313-321.

[78] MOHN WW & TIEDJE JM (1990) *J. Bacteriol.* **172** : 2065-2070.

[79] COLE JR, CASCARELLI JL, MOHN WW & TIEDJE JM (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 3536-3542.

[80] JABLONSKI PE & FERRY JG (1992) *FEMS Microbiol. Lett.* **96** : 55-60.

[81] TERZENBACH DP & BLAUT M (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* **123** : 213-218.

[82] LÖFFLER FE, TIEDJE JM & SANFORD RA (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 4049-4056.

[83] CHRISTIANSEN N, AHRING BK, WOHLFARTH G & DIEKERT G (1998) *FEBS Lett.* **436** : 159-162.

[84] CHRISTIANSEN N & AHRING BK (1996) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46** : 442-448.

[85] MILLER E, WOHLFARTH G & DIEKERT G (1997) *Arch. Microbiol.* **168** : 513-519 ;
MILLER E, WOHLFARTH G & DIEKERT G (1998) *Arch. Microbiol.* **169** : 497-502.

[86] NEUMANN A, WOHLFARTH G & DIEKERT G (1996) *J. Biol. Chem.* **271** : 16515-16519.

[87] HOLLIGER C, WOHLFARTH G & DIEKERT G (1999) *FEMS Microbiol. Reviews* **22** : 383-398.

[88] BRUCE RA, ACHENBACH LA & COATES JD (1999) *Environ. Microbiol.* **1** : 319-331.

[89] MALMQVIST A, WELANDER T, MOORE E, TERNSTROM A, MOLIN G & STENSTROM L-M (1994) *Syst. Appl. Microbiol.* **17** : 58-64 ;
WALLACE W, WARD T, BREEN A & ATTAWAY H (1996) *J. Ind. Microbiol.* **16** : 68-72.

[90] COATES JD, MICHAELIDOU U, BRUCE RA, O'CONNOR SM, CRESPI JN & ACHENBACH LA (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 5234-5241.

CHAPITRE 8

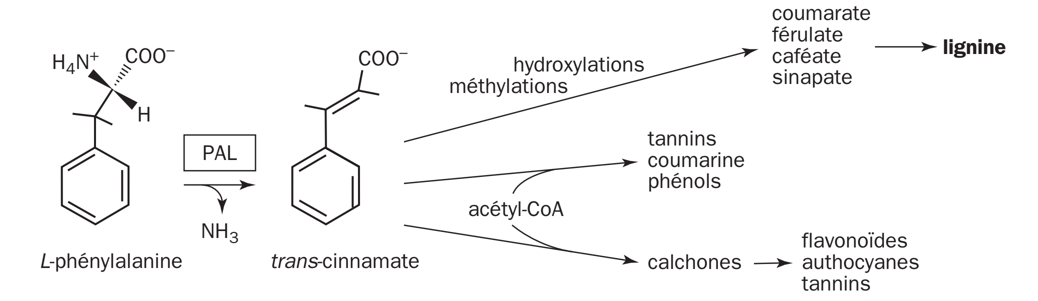
L'OXYGÉNATION DES AROMATIQUES

Les cycles désignés par les chimistes comme aromatiques existent en nombre immense dans l'environnement, déversés massivement en majorité par les végétaux, mais aussi par les activités humaines. Un prélude à leur dégradation par les micro-organismes du sol et des eaux au contact de l'air est une oxygénation qui rend le cycle plus fragile à une attaque ultérieure. Dans ce chapitre sont examinées les transformations initiales des hydrocarbures simples comme le benzène, le toluène et le naphtalène, ainsi que la nature des enzymes responsables. Sont examinées ensuite les voies d'attaque de dérivés simples, hydroxylés, nitrés, chlorés ou fluorés.

8 – L'oxygénation des aromatiques

8.1 - Introduction

Les composés aromatiques étaient déjà présents dans la biosphère depuis les temps les plus anciens puisqu'ils sont présents dans le pétrole et dans la houille. Ils ont été détectés dans de nombreux sédiments géologiques antérieurs au Cambrien. Leur variété dans la nature est immense, et l'activité humaine en a répandu de nombreuses espèces nouvelles. Le benzène est la molécule modèle la plus simple. Les molécules aromatiques ont au moins un cycle insaturé dont les aspects fondamentaux sont rappelés en glossaire. Les hétérocycles aromatiques ne contiennent pas que du carbone, les hétéro-atomes étant le plus souvent O, N et S. Le noyau benzénique (radical phényle) tire son origine de l'érythrose-4-phosphate formé à partir du glucose dans la voie des pentoses, mais n'est assemblé *de novo* que par les végétaux et de nombreuses espèces bactériennes, autotrophes ou non. Sa présence la plus importante est dans les protéines au sein de trois acides aminés (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et dans les produits du règne végétal comme la lignine. La réaction de la phénylalanine-ammoniac lyase (**PAL**) commande la genèse de nombreux produits secondaires et apparaît comme une des plus importantes dans la biosphère.



Le monde vivant est habitué à recycler une grande partie des composés aromatiques naturels. L'industrie humaine a engendré des produits nouveaux, chlorés, nitrés, azotés, ou autres, retrouvés dans la composition de nombreux ingrédients de la vie pratique : dérivés pétroliers, solvants, matières plastiques, peintures et vernis, médicaments, herbicides, insecticides, etc. Ils sont souvent sources de

pollution pour l'environnement et nombreux sont ceux qui sont toxiques pour la faune et la flore. On compte sur les micro-organismes des sols et des eaux pour les recycler. Quelquefois le nettoyage marche tout seul. Dans d'autres cas, il faut l'aider. Heureusement pour nous la flexibilité génétique des agents biologiques et la gamme d'action de leurs enzymes permettent d'éliminer maints composés artificiels. L'insaturation des hydrocarbures aromatiques leur donne un caractère polarisable et une petite solubilité dans l'eau qui est plus accentuée que celle des aliphatiques. Cette propriété est importante dans le cas du benzène dont la solubilité à 25°C est de 22,9 mM, contre 6,29 pour le toluène, 2,02 pour l'*o*-xylène, 1,27 pour l'éthylbenzène et 0,80 pour le naphtalène. Le caractère polaire du phénol lui confère une plus grande solubilité dans l'eau, qui atteint 872 mM à pH 7 et augmente avec le pH (le pKa de la fonction phénolique est proche de 10).

Les cycles aromatiques isolés ou condensés sont des entités stables dont le métabolisme nécessite quelques détours. Nous constaterons deux phases. La première est une préparation du cycle et de ses dépendances, oxydations qui ont pour effet de fragiliser la cible à l'attaque ultérieure. Le cheminement suivant procède par ouverture du cycle aromatique et par des remaniements qui vont engendrer des produits du métabolisme intermédiaire, comme le succinate, l'acétyl-CoA, le malate et autres intermédiaires de base. La même tactique est observée dans d'autres métabolismes. Par exemple la dégradation bien connue du glucose dans la glycolyse, dont le principe est très différent, présente aussi une phase de préparation par des phosphorylations, aboutissant au fructose-bisphosphate. La deuxième phase s'empresse de scinder ce dernier et aboutira à l'acétyl-CoA. Le substrat est donc fragilisé avant l'écroulement de sa structure.

Ce chapitre ne concerne que les toutes premières réactions d'oxydation, c'est-à-dire la phase de préparation. L'action des oxygénases va fragiliser le cycle à l'attaque ultérieure, quitte à le débarrasser en même temps de substituants latéraux ou à les remplacer. Le démantèlement complet du cycle est une seconde phase qui fera l'objet des chapitres suivants.

8.2 - L'OXYGÉNATION DU BENZÈNE

Le cycle benzénique est fortement stabilisé par son énergie de résonance résultant de la délocalisation uniforme des électrons dans le noyau. Son oxydation en chimie nécessite des conditions drastiques [1], comme si un réactif placé en face d'un cycle totalement symétrique ne savait pas, tel l'âne de Buridan, par quel côté commencer. Aussi les cycles aromatiques sont-ils en principe très solides et leur chimie est très différente de celle des oléfines conjuguées comme le butadiène ou l'isoprène. Le cycle est fragilisé par l'introduction d'un ou deux substituants oxygénés. Le caractère biodégradable du benzène a été pressenti en Allemagne dès 1913, mais le mécanisme mis en jeu était inconnu. L'existence de nombreuses espèces

---

1 - Par exemple l'oxygène et l'oxyde de vanadium à 450°C, avec formation d'anhydride maléique.

capables d'attaquer le benzène en aérobiose a été une bonne surprise, car il s'agit d'une pollution pétrolière qu'on supposait coriace. Les *Pseudomonas* abondent dans cette opération, mais ne sont pas les seuls agents compétents. L'oxydation du benzène en catéchol par *Nocardia corallina* a été montrée pour la première fois à la fin des années cinquante avant d'être confirmée chez un *Aerobacter* **[1]**. La formation d'un diol intermédiaire n'a été établie qu'en 1968 par GIBSON et coll. **[2]**. Le principe est le suivant : il y a double hydroxylation par une **dioxygénase**, qui introduit les deux atomes d'oxygène d'O_2 sur des carbones adjacents.

Dioxygénation du benzène

Ce système enzymatique exige une source d'électrons, à la différence d'autres dioxygénases rencontrées plus loin. Elle catalyse la première réaction du schéma, la seconde étant réalisée par une déshydrogénase. On peut constater qu'il n'y a aucun gain net en NAD^+ ou NADH à l'issue de ces deux réactions. Le caractère aromatique est momentanément perdu dans l'intermédiaire formé qui est un *cis*-dihydrodiol où les deux hydroxyles sont portés du même côté du plan. Le produit est ici le *cis*-benzène dihydrodiol [2]. La vérification rigoureuse d'une oxygénation consiste à utiliser du dioxygène enrichi en oxygène-18 et à constater l'incorporation de l'isotope dans le produit de la réaction **[3]**. Un mutant privé de la déshydrogénase accumule le dihydrodiol en présence de benzène sans pouvoir le métaboliser.

La benzène dioxygénase (EC 1.14.12.3), appelée quelquefois benzène hydroxylase, a des caractères fondamentaux importants. C'est un complexe associant trois protéines, soit une réductase flavinique de 81 kDa oxydant le NADH, une ferrédoxine spéciale appartenant à la famille des *protéines de* RIESKE* et la benzène dioxygénase proprement dite (215 kDa).

La benzène dioxygénase

2 - *Exactement le cis-2,3-dihydroxy-cyclohéxa-4,6-diène.*

Celle-ci est un trimère de structure $\alpha_3\,\beta_3$ contenant des sous-unités α (54 kDa) et β (23 kDa). Chaque α détient un centre [2Fe-2S], du type qu'on trouve dans la ferrédoxine des chloroplastes végétaux, et un ion Fe. Le complexe été analysé pour la première fois par GEARY et coll. à l'aide d'une souche de *Pseudomonas putida* cultivée sur benzène comme seule source de carbone et d'énergie **[4]**. Un petit diagramme symbolise la chaîne des oxydoréductions. La flavine récupère 2 électrons, les cède un à un à la ferrédoxine (Fd) qui n'a qu'un seul noyau fer-soufre. La ferrédoxine transmet les électrons aux centres fer-soufre de la dioxygénase.

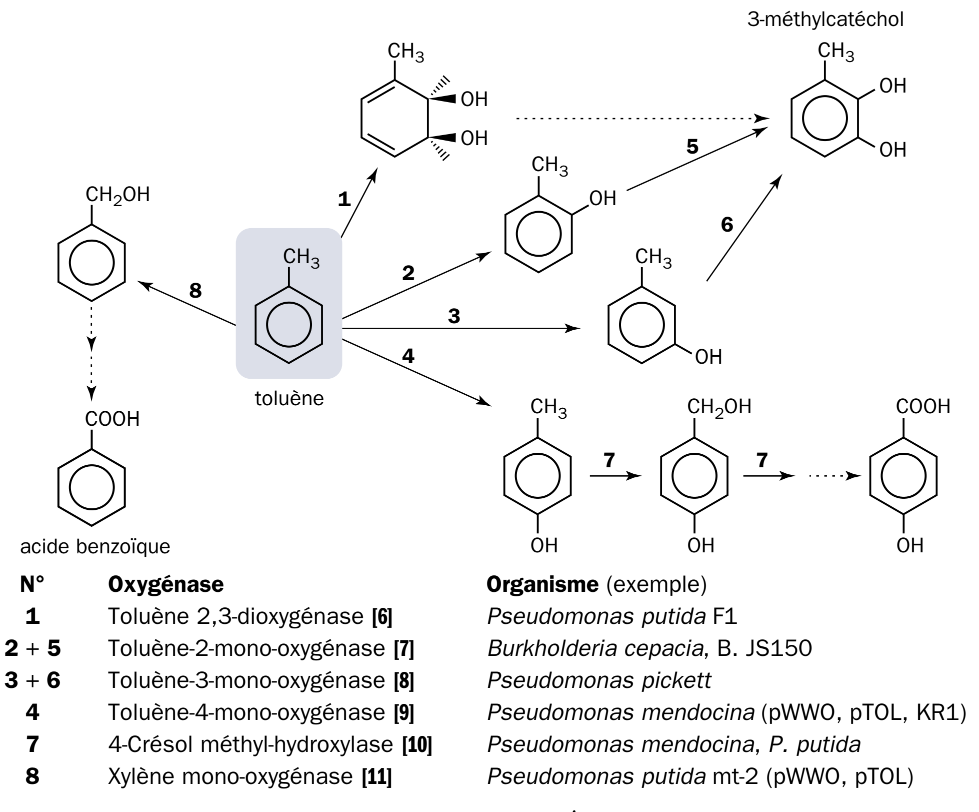
Ce modèle est caractéristique des oxygénases qui dépendent d'un apport d'éléments réducteurs. Les sources d'électrons les plus banales sont NADH ou NADPH qui ne sont utilisés qu'avec l'aide d'une protéine flavinique comportant éventuellement des éléments fer-soufre, et cataloguée comme réductase. Elle transmet les électrons à la dioxygénase par le canal de la ferrédoxine. Le complexe formé par les trois protéines peut être dissocié expérimentalement en ses éléments, puis reconstitué en dioxygénase active à condition d'ajouter des ions Fe^{2+}. En effet l'enzyme terminale qui est la dioxygénase proprement dite, a besoin de ces ions pour fonctionner. Chaque site actif renfermerait un centre mono-métallique représenté par le fer. La protéine contient un motif consensus DExRH qu'on retrouve dans d'autres enzymes de la même famille.

L'oxygénation de nombreux composés aromatiques à un ou plusieurs cycles se fait sur le même principe que celle du benzène et engendre un *cis,cis*-dihydrodiol. Il existe une grande famille d'enzymes de ce type, les arène dioxygénases (EC 1.14.12.x), qui présentent des différences de détail mais une organisation commune **[5]**. Le complexe à trois composants contient une réductase fer-soufre à FAD, une ferrédoxine à centre [2Fe-2S] et la partie oxygénase proprement dite. Celle-ci est multimérique de type $\alpha_3\beta_3$, contient en nombre égal des sous-unités α de 50-55 kDa et des sous-unités β de 20-25 kDa. Cette partie du complexe est parfois désignée comme ISP (*iron-sulfur protein*). Chaque chaîne α possède un centre [2Fe-2S] qui est toujours *de type RIESKE**, et du fer, dont la présence est indispensable. Nous constaterons que ce modèle enzymatique s'applique à de nombreux substrats, malgré quelques divergences. Le centre métallique contiendra deux Fe ou n'en possèdera qu'un seul (comme dans le cas de l'enzyme du benzène). Des différences s'observeront sur le mode d'action. L'hydroxylation pourra se faire sur le noyau ou sur un groupe latéral, être double (dioxygénase) ou simple (mono-oxygénase). Toutes ces oxygénases ont besoin d'une source auxiiaire d'électrons.

8.3 - L'ATTAQUE DU TOLUÈNE ET DU STYRÈNE

L'oxydation du toluène (méthylbenzène) ou du styrène (vinylbenzène) illustre la variété des procédés mis en jeu. Ces entités sont présentes dans le pétrole et divers végétaux. Il n'existe pas moins de cinq voies pour attaquer le toluène en aérobiose. L'une d'elles se fait sur le principe de la dioxygénase du benzène. Elle est récapitulée par un schéma. Parmi les germes aérobies les plus performants pour

se développer sur ces aromatiques figurent presque toujours en première ligne les *Pseudomonas* et apparentés. Les hydroxylations ont été notées par un numéro, et les déshydrogénations sont indiquées par les flèches en pointillé.



N°	Oxygénase	Organisme (exemple)
1	Toluène 2,3-dioxygénase **[6]**	*Pseudomonas putida* F1
2 + **5**	Toluène-2-mono-oxygénase **[7]**	*Burkholderia cepacia*, B. JS150
3 + **6**	Toluène-3-mono-oxygénase **[8]**	*Pseudomonas pickett*
4	Toluène-4-mono-oxygénase **[9]**	*Pseudomonas mendocina* (pWWO, pTOL, KR1)
7	4-Crésol méthyl-hydroxylase **[10]**	*Pseudomonas mendocina*, *P. putida*
8	Xylène mono-oxygénase **[11]**	*Pseudomonas putida* mt-2 (pWWO, pTOL)

Les voies du toluène

Plusieurs informations intéressantes sont à noter :

- La toluène dioxygénase de la réaction **1** forme un *cis*-dihydrodiol [3] et ressemble au complexe de la benzène dioxygénase avec réductase, ferrédoxine et enzyme fer-soufre. Cette dernière est souvent désignée par ISP_{TOL}. La source d'électrons est NADH ou NADPH. L'action de ce système ne se limite pas au toluène, mais s'exerce sur une gamme étendue de substrats et nous aurons l'occasion d'y revenir.
- Le toluène est aussi la cible de plusieurs mono-oxygénases, qui s'attaquent au cycle en *ortho*, *méta* ou *para* (positions 2, 3 ou 4), ou au méthyle (réaction **8**) en laissant le cycle intact. L'oxydation engendre alors l'alcool benzylique, qui sera transformé par deux déshydrogénations successives en acide benzoïque. Le nom de l'enzyme fait référence aux xylènes (*o*-, *m*- ou *p*-diméthylbenzène) car c'est le premier mode d'attaque de ces produits. La transformation du toluène en acide

3 - Le (+)-cis-1S,2R-dihydroxy-3-méthylcyclohexa-3,5-diène.

benzoïque est codée par le plasmide TOL rendu célèbre par la recherche génétique et biochimique, et que nous retrouverons au chapitre 10.

- Les oxygénases concernées sont peu sélectives, et peuvent s'attaquer à des substrats variés, notamment aux aromatiques chlorés et polychlorés. On les voit parfois effectuer deux hydroxylations successives, comme dans les réactions **2** et **5**, **3** et **6** qui sont à l'origine du 3-méthylcatéchol.
- Ces différentes mono-oxygénases sont aussi construites sur le même plan que la dioxygénase du benzène. Par exemple la 4-mono-oxygénase (réaction **4**) est séparable en trois éléments, puis reconstituée en récupérant alors son activité en présence d'ions fer. Un noyau bi-métallique essentiel est présent. Le mécanisme est similaire malgré l'introduction d'un seul hydroxyle sur le cycle, mais une protéine spéciale prend le relais pour la deuxième hydroxylation.
- La réaction **7** offre un cadre particulier. L'hydroxylation sur le méthyle du *p*-crésol (ou *p*-méthylphénol) engendre l'alcool *p*-hydroxybenzylique, puis le *p*-hydroxybenzaldéhyde. L'enzyme est répertoriée comme méthylhydroxylase mais c'est en fait une déshydrogénase. Pourquoi ? L'hydroxylation diffère totalement des précédentes par son mécanisme. La présence de l'hydroxyle en *para* sur le cycle renforce la susceptibilité du méthyle à l'oxydation, et l'enzyme est un flavocytochrome périplasmique de structure $\alpha_2\,\beta_2$. Les sous-unités α de 49 kDa contiennent chacune du FAD attaché par liaison covalente, et chaque chaîne β (9 kDa) est un cytochrome c. La réaction est de type radicalaire et comporte une déshydrogénation **[12]**. Elle est suivie de l'addition d'une molécule d'eau. L'atome d'oxygène est donc fourni par le solvant et l'enzyme peut se passer complètement du dioxygène [4]. C'est en quelque sorte une hydroxylation de type anaérobie. La déshydrogénation de l'alcool 4-hydroxybenzylique en l'aldéhyde est catalysée dans la foulée.

Revenons à la double hydroxylation du cycle catalysée par les dioxygénases du benzène et du toluène. L'orientation *cis* du diol a été démontrée sans ambiguïté et représente une stratégie d'attaque purement bactérienne. Le procédé utilisé par les champignons et les animaux n'est pas le même. La mono-oxygénase introduit ici un seul atome d'oxygène sur le cycle et conduit à époxyde. L'hydratation de celui-ci donne l'isomère *trans*-diol à la place du *cis*-diol. Cette opération s'observe dans le foie animal, où de nombreux composés sont détoxifiés par oxygénation [5]. Les catalyseurs sont des *cytochromes P450**. Malgré cela le résultat final est le même, c'est-à-dire un catéchol.

Le naufrage en 2000 dans la Manche d'un navire transportant du styrène est venue attirer l'attention sur les risques de pollution par ce produit. Le styrène peut s'évaporer en partie dans l'atmosphère, mais une polymérisation radicalaire en composés plus ou moins biologiquement inertes est déclenchée par une élévation de température, l'action de la lumière ou la présence d'un peroxyde.

---

4 - *Une survivance évolutive ancienne a été suggérée, le métabolisme des aromatiques étant antérieur à la montée de l'oxygène atmosphérique.*

5 - *Les époxydes sont éventuellement cancérigènes plus dangereux que le composé de départ. Ce phénomène est à l'origine de la toxicité particulière du benzène.*

NADH + H^+ NAD^+
H_2O
H
OH
OH
H
catéchol
O_2 H_2O
benzène (époxyde) (*trans*-dihydrodiol)

La méthode des champignons et des mammifères

Bactéries et champignons peuvent heureusement contribuer à l'élimination du styrène dans certaines limites de concentration (10-500 µM). Peu soluble, il est introduit dans les cultures de laboratoire sous forme vapeur par barbotage, ou en solution saturée. Le styrène est donc peu rémanent dans l'eau, avec une vie moyenne de l'ordre de 2 jours, mais on le soupçonne d'avoir des effets néfastes sur la flore et la faune, et d'être cancérigène. Il y a deux cas de figure comme pour le toluène, selon que l'attaque commence sur la chaîne latérale ou sur le cycle.

CH_2OH
CHOH
CH_2
CH
O_2
(NDO)
CH_2
O
CH
styrène

La chaîne vinylique est elle-même oxydée de deux façons, soit par dioxygénase conduisant à un glycol, soit par mono-oxygénation donnant un époxyde. Dans le premier cas, l'enzyme est la naphtalène dioxygénase (NDO) de *Pseudomonas* NCIB **[13]**, qui est très peu sélective. Nous la retrouverons plus loin. Dans le second cas se forme le cycle triangulaire d'un époxyde. L'enzyme est la mono-oxygénase **flavinique** d'une autre souche de *Pseudomonas* et exprimée dans le colibacille [6]. L'oxygénation ne produit qu'un seul des deux énantiomères **[14]**.

Ces transformations du styrène présentent de petites variantes naturelles. Une levure, *Exophiala jeanselmei*, fait également un époxyde sur la chaîne latérale vinylique, mais l'enzyme est un cytochrome P450 couplé à une réductase flavinique **[15]**. Cette levure dégrade ensuite l'époxyde en phénylacétate puis en homogentisate. La deuxième stratégie repose sur la dioxygénase du cycle et une déshydrogénation comme pour le benzène ou le toluène.

---

6 - *Le métabolisme est commandé par des gènes groupés sur un plasmide. Il se poursuit par formation de phénylacétaldéhyde, phénylacétate, phénylacétyl-CoA. Le colibacille muni du plasmide peut croître sur styrène comme seule source de carbone.*

La source d'électrons est NADH qui est recyclé de la même manière. Cette voie a été examinée notamment chez un *Rhodococcus rhodocrous* capable de croître sur styrène, toluène, éthylbenzène et benzène **[16]**.

styrène

La scission ultérieure du 3-vinylcatéchol se fera par dioxygénase, soit à la position 1 (ouverture *méta*), soit à la position 2 (ouverture *ortho*). Le germe étudié avait les deux types de dioxygénase. Seule la voie *méta* permettait à *Rhodococcus* de dégrader entièrement le styrène, car la dioxygénase *ortho* produisait un vinylmuconate réfractaire et rejeté dans le milieu.

Voici pour finir une application célèbre de la styrène mono-oxygénase, à l'origine d'une magnifique couleur bleue sur milieu de culture gélosé en présence d'indole. Deux souches de *Pseudomonas putida* transforment l'indole en indigo [7]. Les enzymes responsables sont la mono-oxygénase et l'isomérase qui prend le relais. Le styrène est le meilleur inducteur de l'enzyme **[17]**. Le tableau montre la transformation conjointe du styrène, de l'indène et de l'indole. L'indigo provient de la dimérisation spontanée de l'indoxyle.

styrène — phénylacétaldéhyde

indène — 2-indanone

indole — indoxyl (3-oxindole)

indigo

Synthèse de l'indigo à partir de l'indole

7 - Le colorant végétal est tiré des feuilles et des tiges d'un arbuste cultivé dans les pays chauds, Indigofera tinctoria. Synthétisé industriellement à partir de l'aniline. Le pourpre antique est un dérivé dibromé de l'indigo.

L'examen des mutants appropriés a montré que la mono-oxygénation produisait un époxyde intermédiaire. La formation de l'indigo est une propriété qui avait fait sensation en 1983 après avoir été découverte chez un colibacille **[18]** porteur d'un fragment du plasmide NAH7. Celui-ci détermine les enzymes de dégradation du naphtalène, en particulier la naphtalène dioxygénase que nous rencontrerons plus loin. Elle est très peu spécifique et oxyde aussi l'indole. Que venait faire l'indole ? L'enzyme du colibacille appelée tryptophanase génère de l'indole à partir du tryptophane. Cette propriété est caractéristique de la bactérie quand elle croît en présence de l'acide aminé. L'indole formé est excrété dans le milieu. La souche modifiée génétiquement avec NAH7 récupère cet indole et en fait de l'indigo. Cette propriété a été reprise sur le plan pratique. La couleur bleue révèle que le gène de l'oxygénase est présent et qu'il est transcrit. On s'arrange pour qu'il soit soudé en tandem à d'autres gènes dont la régulation est étudiée. Toute expression des protéines correspondantes sur un milieu contenant du tryptophane s'accompagne de celle de la dioxygénase et se traduit par une couleur bleue. Cette méthode permet donc de passer au crible un grand nombre de colonies bactériennes sur boîte et de repérer celles qui expriment les protéines examinées. Les sections suivantes vont souligner l'importance considérable des oxygénases dans les biodégradations en milieu oxygéné.

8.4 - DES OXYGÉNASES AUX CIBLES NOMBREUSES ET VARIÉES

Les enzymes qui prennent le toluène pour cible sont capables de dégrader des substrats très différents, voire non aromatiques comme le trichloréthylène **[19]**. Une souche de *Pseudomonas putida* se sert de sa toluène dioxygénase pour oxyder une belle panoplie de substrats dont le phénol, les chlorophénols, certains dichlorophénols, le naphtalène, divers hydrocarbures aromatiques et l'incontournable trichloréthylène **[20]** ! Une autre souche utilise la dioxygénase contre des alcènes chlorés de longueur variable **[21]**.

Le complexe de la toluène 2,3-dioxygénase n'est guère différent dans son principe de celui de la benzène dioxygénase. Il est codé par quatre gènes, *todA*, *todB*, *todC1* et *todC2*.

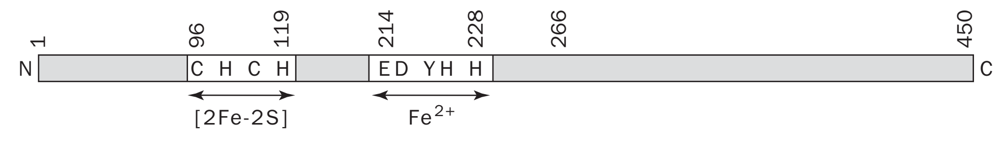
NADH + H^+ → NAD^+ ; FAD / *réductase* (TodA) / $FADH_2$; Fd_{red} / (TodB) / Fd_{ox} ; Enz_{ox} / ISP_{TOL} (TodC1) / Enz_{red} ; CH_3 (toluène) + O_2 → CH_3, OH, OH (cis-dihydrodiol)

La toluène dioxygénase

Les deux derniers codent pour la dioxygénase proprement dite désignée dans la littérature par ISP_{TOL}, de structure $\alpha_3\beta_3$. Ce sont les chaînes α (TodC1) dotées chacune d'un site catalytique, d'un centre [2Fe-2S] de type RIESKE, et ici d'un seul ion Fe^{2+}.

Le centre mono-métallique est considéré comme le lieu d'activation du dioxygène selon un mécanisme qui comporte un transfert des électrons au métal par le canal du noyau [2Fe-2S]. Il caractérise une vaste famille d'enzymes distinctes de celle de la benzène dioxygénase de *Pseudomonas putida* F1. On lui connaissait déjà en 2002 plus de 25 enzymes différentes dont la plupart étaient des dioxygénases bactériennes fonctionnant sur des substrats aromatiques. Cette famille renferme aussi une benzène dioxygénase de *Pseudomonas putida*, mais dans une souche différente de la précédente (BE-81 **[22]**). Toutes ces dioxygénases catalysent la formation d'un *cis*-dihydrodiol sur le cycle aromatique et sont donc associés à une réductase et une ferrédoxine. Mais elles appartiennent à deux ensembles qui se distinguent par la séquence et la nature de leur noyau métallique. Dans l'une d'elles se trouvent deux ions Fe pontés par un oxygène, dans l'autre un seul ion Fe. Toutes sont en général peu sélectives. Les réactions catalysées vont de la mono-oxygénation à la désalkylation, à la désaturation des liaisons carbone-carbone et à l'enlèvement d'un atome d'halogène sur des substrats variés. La toluène 2,3-dioxygénase et la naphtalène dioxygénase (section suivante) sont caractéristiques de cette catégorie d'enzymes très polyvalentes.

La similitude d'organisation structurale entre les enzymes d'une même famille se traduit par la conservation de certains motifs de séquence. Un diagramme symbolise la séquence d'une chaîne α de la toluène dioxygénase, où se rencontrent le segment qui lie le noyau fer-soufre et celui qui porte le fer **[23]**.



ToDC1

Le consensus $CxHx_{18}CxxH$ est typique d'un noyau fer-soufre de type RIESKE. Un autre consensus lié à la coordination du fer est : $ExxxxDxYHxxxxHx_{37}Y$. Il reste quasi identique dans tous les termes de la famille. L'analyse de la séquence est donc primordiale. Il permet de se faire une idée sur la structure de l'enzyme avant même que l'étude biochimique détaillée ait été réalisée. L'intérêt pratique lié aux études portant sur la toluène 2,3-dioxygénase vient de l'extraordinaire souplesse d'action de cette enzyme qui ne se contente pas de dioxygéner le toluène, mais transforme une multitude de substrats aromatiques ou non, soit par dioxygénation, soit par mono-oxygénation. Elle peut désalkyler l'anisole, le phénatole et autres substrats **[24]**, effectuer des sulfoxydations **[25]**, oxyder les nitrotoluènes (section 7), hydroxyler le phénol et le 2,5-dichlorophénol **[26]**, faire sauter enfin le chlore du trichloréthylène **[27]**. Au point que l'on peut se demander si la dioxygénase ne s'est pas tournée vers le toluène par hasard alors qu'elle était initialement prévue dans la nature pour d'autres usages. Cette multiplicité de compétences provient

probablement du mode d'action, qui consiste à exacerber la réactivité de l'oxygène en contact avec le fer dans une poche plus ou moins hydrophobe au sein du site actif. L'oxygène ainsi mis en place reçoit la cible dans une cavité dont la géométrie peut s'accommoder de l'arrivée de substrats aux formes variées. Un thème de recherche consiste à modifier le site par mutagenèse dirigée, de façon à créer de nouvelles oxygénases actives contre d'autres substrats !

La méthode d'approche par mutagenèse a été pratiquée sur la toluène 4-mono-oxygénase de *Pseudomonas mendocina* KR1. Cette enzyme (212 kDa), de structure $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, est logée comme d'habitude dans un complexe multi-protéique et porte un centre Fe bi-métallique sur chaque chaîne α. Elle peut hydroxyler, soit le cycle aromatique du toluène et des *o*- et *m*-xylènes, soit un méthyle latéral dans le *p*-xylène. Les transformations indiquées par les flèches sont les réactions dominantes observées **[28]**.

La 4-mono-oxygénase sur toluène et xylène

Des mutations ponctuelles réalisées au voisinage du noyau bi-métallique provoquent une déviation dans les orientations préférentielles. La figure montre l'une d'elles par la flèche en pointillé. Le remplacement d'une glutamine proche de l'un des atomes de fer par une cystéine dévie la transformation en faveur de l'hydroxylation du cycle (*p*-xylénol). La même opération sur une phénylalanine voisine oblige l'enzyme à faire du xylénol et de l'alcool méthylbenzylique à parts presque égales. Les sites transformés ne lient pas directement le fer, mais contribuent à façonner la poche du site actif. On en tire deux enseignements. Tout d'abord l'enzyme peut aussi bien hydroxyler le cycle qu'un méthyle latéral. Cette propriété est répandue parmi ces oxygénases et paraît assez extraordinaire, car la réactivité d'un méthyle latéral ne devrait pas ressembler à celle des positions carbonées du cycle. Le deuxième facteur important est le positionnement du substrat au voisinage de l'oxygène activé selon une orientation imposée par la géométrie du site.

La toluène 3-mono-oxygenase de *Pseudomonas puckettii* PKO1 appartient à la même famille que la 4-mono-oxygénase. Elle a été décrite à l'origine comme une phénol hydroxylase car issue d'une souche qui peut se développer sur phénol

comme seule source de carbone et d'énergie. Elle a été la première enzyme trouvée comme capable d'hydroxyler le toluène en *méta*. Des substrats multiples sont utilisés là aussi, notamment les trois crésols transformés en un méthyl-catéchol, le benzène et l'éthylbenzène transformés en phénol et éthylphénol **[29]**. Enfin la 2-mono-oxygénase de *Burkholderia cepacia* G4 appartient à la même veine avec ses trois composants ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$, 211 kDa). Les chaînes α ont un centre bi-métallique. Elle transforme le toluène successivement en *o*-crésol et 3-méthylcatéchol.

Un alignement de séquences partielles est tiré de quatre mono-oxygénases où siègent des centres bi-métalliques **[30]**, soit :
1 - la toluène 3-mono-oxygénase de *Burkholderia pickettii* pKO1,
2 - la toluène 4-mono-oxygénase de *Pseudomonas mendocina* KR1,
3 - la phénol hydroxylase de *Pseudomonas putida* CF600,
4 - la mono-oxygénase de *Methylosinus trichosporium*.

```
                132
1 : T–3m    L – – – D E N R H G Q L Q L Y F P H D Y C —//——— A – I
2 : T–4m    M – – – D E L R H G Q L Q L Y F P H E Y C ——//——— A – I
3 : Ph.hyd  Q – A I D E L R H V Q T Q V H A M S H Y – ———//—— W Y L
4 : CH4m    L – – – D E I R H T H Q C A F I N H Y Y – ————//— W – K

1 : A A R S T F D D L F M S R S A I D I A I M L T F A F E T G F T N M Q
2 : S V P K S Y M D D A R T A G P F E F L T A V S F S F E Y V L T N L L
3 : A A K H F F D D I I T G R D A I S V A I M L T F S F E T G F T N L Q
4 : G M K R V F A D G F I S R D A V E C S V N L Q L V G D T C F T N P L

                                                      237
1 : F V P F M S – G A A Y N G D M A T V T F G F S A Q S D E A R H – M
2 : F L G L A A – D A A E A G D F T F A S L I S S I Q T D E S R H A Q
3 : F L G L A A – D A A E A G D Y T F A N L I S S I Q T D E S R H A Q
4 : I V A V T E W A I G N G D E I T P T V F – L S V E T D E L R H – M
```

Exemple d'homologie entre 4 mono-oxygénases

L'alignement permet de repérer la position des deux motifs DExRH qui lient le centre bi-métallique dans la chaîne α. Outre les résidus identiques encadrés, il y a des remplacements d'une séquence à l'autre par des résidus de même nature (D et E, S et T, F et Y, L et V). Les 3- et 4-mono-oxygénases sont presque identiques sur un segment d'une trentaine d'acides aminés. La recette des oxygénations par noyau bi-métallique semble avoir connu un certain succès au cours de l'évolution, et ne se limite pas au seul cycle aromatique ou au méthane. Il y a tout lieu de penser qu'elle est répandue. On la retrouve par exemple dans l'alcène mono-oxygénase d'un *Xanthobacter* avec des caractères qui rappellent en tout point les enzymes précitées **[31]**. En somme ces différentes oxygénases montrent des potentialités étendues tout à fait remarquables par leur souplesse de fonctionnement, bien illustrée dans la section suivante. Leur site catalytique renferme un noyau mono-métallique (toluène 2,3-dioxygénase) ou bi-métallique (mono-oxygénases), mais il est clair que toutes ces protéines sont pourtant construites sur un thème structural commun.

8.5 - La naphtalène dioxygénase

Le naphtalène [8] fait partie des hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP, abondants dans les produits pétroliers et dans les gaz d'échappement. La dioxygénase bactérienne du naphtalène rappelle tout à fait celle du benzène et engendre un *cis*-dihydrodiol. Mais la naphtalène dioxygénase (EC 1.14.12.12) présente des capacités époustouflantes par la variété des substrats exposés à sa vindicte, et va encore plus loin que la toluène dioxygénase. On lui connaît le pouvoir de catalyser au moins 75 réactions ! En outre l'enzyme est stéréo-sélective, c'est-à-dire que les produits formés sont des énantiomères déterminés. Une propriété susceptible de faciliter la préparation d'intermédiaires asymétriques dans la synthèse de molécules pharmaceutiques. Nous savons que la dioxygénase hydroxyle l'indole et conduit à la formation d'indigo **[32]**, et cette propriété sert de base à un test colorimétrique très commode pour les dosages de l'enzyme. La naphtalène dioxygénase fait partie des nombreuses protéines du même type aujourd'hui caractérisées, sans compter celles dont la présence a été détectée par le séquençage des gènes (plus de 40 sur la base des homologies). Rappelons ses caractères essentiels. L'oxygénation est réalisée par un ensemble de trois protéines formant une courte chaîne d'oxydoréduction entre le NAD(P)H et l'oxygénase proprement dite, comme pour la dioxygénase du toluène. L'oxygénase terminale (ISP) est un homo-multimère à plusieurs sous-unités α identiques ou un hétéro-multimère de sous-unités α et β en nombre égal. Chaque chaîne α renferme un noyau fer-soufre de type Rieske et un site actif monométallique contenant du fer. La naphtalène dioxygénase d'un *Pseudomonas* est un hexamère $\alpha_3\beta_3$, et sa structure détaillée est maintenant disponible **[33]**. La plupart des dioxygénases de ce type ont une spécificité élastique et sont stéréosélectives. Elles fonctionnent volontiers à la fois comme dioxygénases du cycle aromatique ou comme mono-oxygénases.

On s'épargnera le catalogue fastidieux de toutes les réactions catalysées par la naphtalène dioxygénase, pour ne retenir que des exemples caractéristiques. Pour faciliter le cas échéant les recherches, les substrats connus pour chaque mode réactionnel sont listés en note.

- **Dioxygénase d'hydrocarbures aromatiques [9]**
  Le substrat phare est évidemment le naphtalène. L'oxydation s'effectue le plus souvent sur un cycle, parfois sur un substituant latéral **[34]**. L'enzyme attaque aussi le 1,2-dihydronaphtalène, avec obtention de différents énantiomères selon les souches **[35]**. Nous retrouvons ici l'attaque du styrène entrevue antérieurement.

---

8 - *L'orthographe anglo-saxonne étant naphth**h**alene.*

9 - *Exemples de substrats : acénaphtylène ; anthracène ; benzocyclohept-1-ène ; biphényl ; 9,10-dihydroanthracène ; dihydronaphtalène ; 9,10-dihydrophénanthrène ; 2,6- ou 2,3-diméthylnaphtalène ; fluorène ; indène ; indénol ; 2-méthoxynaphtalène ; naphtalène ; naphtoïque (acide) ; 2-nitronaphtalène ; phénanthrène ; styrène.*
Les produits formés à partir des substrats représentés sont :
cis-(1R,2S)-dihydroxy-1,2-dihydronaphtalène, cis-(1R,2S)-indanediol, (2R,3S)-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl, cis-(1R,2S)-dihydroxy-1,2-dihydroanthracène, (R)-1-phényl-1,2-éthanediol.

naphtalène indène biphényl anthracène styrène

- **Dioxygénase de composés hétérocycliques** [10]

  L'indole est l'un de ceux-là. Le dihydrodiol formé se déshydrate et s'oxyde à l'air pour donner l'indigo. Le dibenzothiophène est un xénobiotique qu'aucun organisme connu n'arrive seul à dégrader. La dibenzo-1,4-dioxine est le noyau de base des dioxines polychlorées sur lesquelles nous reviendrons plus tard. L'action de la dioxygénase symbolisée ici n'est pas le seul mode d'attaque sur cette dioxine **[32,36]**.

indole H_2O *oxydation et dimérisation* indigo

dibenzothiophène dibenzo-1,4-dioxine

- **Mono-oxygénations** (nombreuses) [11]

  Parmi les substrats, nous retrouvons le toluène qui est transformé en alcool benzylique **[37]**. L'enzyme catalyse plusieurs réactions à la suite sur l'éthylbenzène, conduisant à l'acétophénone comme intermédiaire [12]. On voit que la mono-oxygénation porte volontiers sur un carbone saturé.

---

10 - Dibenzo-1,4-dioxine ; dibenzofurane ; indole. Les produits formés (ligne du bas) sont le cis-(1R,2S)-dihydroxy-1,2-dihydrodibenzothiophène et le cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrodibenzo[1,4]dioxane.

11 - acénaphtène ; acénaphtène-1-ol ; benzocyclobutène ; carbazole ; 9,10-dihydrophénanthrène ; indane ; indène ; 1- ou 2-indanone ; éthylbenzène ; toluène ; 1,2,4-triméthylbenzène.

12 - Le passage du 1-phénéthylalcool à l'acétophénone n'est pas catalysé par une déshydrogénase, ce qu'on pourrait penser a priori, mais par la dioxygénase, selon un mécanisme discuté par LEE et GIBSON (1996). Un phénomène du même genre a été aperçu dans le cas de la toluène dioxygénase.

toluène éthylbenzène acétophénone

fluorène

9-fluorénol

1,2,4-triméthylbenzène

- Réactions de **désaturation** *et* **O-** ou **N-désalkylation** sur divers composés [13]
  L'anisole et le phénétole sont transformés en phénol, l'éthylbenzène est transformé en styrène [**38**]. Celui-ci est oxydé à son tour par oxygénation de la double liaison vinylique.

anisole phénol phénétole éthylbenzène styrène

- Des **sulfoxydations** [14]
  Un atome d'oxygène est fixé au soufre [**39**]. La diméthylsulfure est un composé naturel et son oxydation en diméthylsulfoxyde intervient dans l'environnement. L'oxydation concerne ici des sulfures variés dont voici seulement trois exemples.

dibenzothiophène méthyl-phényl-sulfure méthyl-p-nitrophényl-sulfure

---

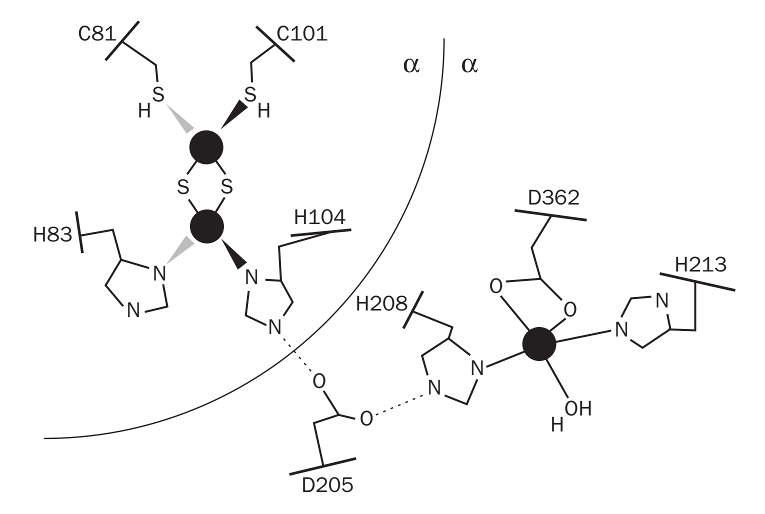
13 - *Sur anisole 1,2-dihydroxynaphtalène, N,N-diméthylaniline, éthylbenzène, indanol ; indane, N-méthylaniline ; N-méthylindole, phénétole.*

14 - *Dibenzothiophène ; éthyl-phénylsulfure ; 2-méthylbenzo-1,3-dithiole ; méthyl-phénylsulfure ; méthyl-p-nitrophénylsulfure ; méthyl-p-tolylsulfure. Transformés en sulfoxydes correspondants.*

Revenons à la structure de la naphtalène dioxygénase. Rappelons que l'enzyme est un hexamère $\alpha_3\,\beta_3$, avec un site actif et un fer-soufre sur chaque sous-unité α. Voici la séquence des 409 acides aminés de ces sous-unités dans l'enzyme de *Pseudomonas aeruginosa*.

MNYKNKNLVS	ESGLTQKHLI	HGDEELFQRE	LETIFARNWL	FLTHDSLIPS	PGDYVTAKMG	(60)
VDEVIVSRQN	DGSIRAFLNV	CRHRGKTLVH	AEAGNAKGFV	CSYHGWGFGA	NGELQSVPFE	(120)
KELYGEALDK	KCMGLKEVAR	VESFHGFIYG	CFDEEAPSLK	DYMGDAGWYL	EPMFKHSGGL	(180)
ELIGPPGKVI	IKANWKAPAE	NFTGDAYHVG	WTHASSLRSG	QSVFSSLAGN	AALPPEGAGL	(240)
QMTSKYGSGM	GVLWDGYSGV	HSADLVPELM	AFGGAKQERL	NKEIGEVRAR	IYRSHLNCTV	(300)
FPNNSFLTCS	GVFKVWHPID	ANTTEVWTYA	MVEKDMPEDL	KRRLVDAVQR	TFGPAGFWES	(360)
DDNDNMETVS	QNAKKYQSRD	GDLVSNLGFG	GDVYGDEVYP	GIVGKSAIGE	TSYRGFYRAY	(420)
GAHISSSSWA	EFEDVSKNWH	TELAKTTDR				(449)

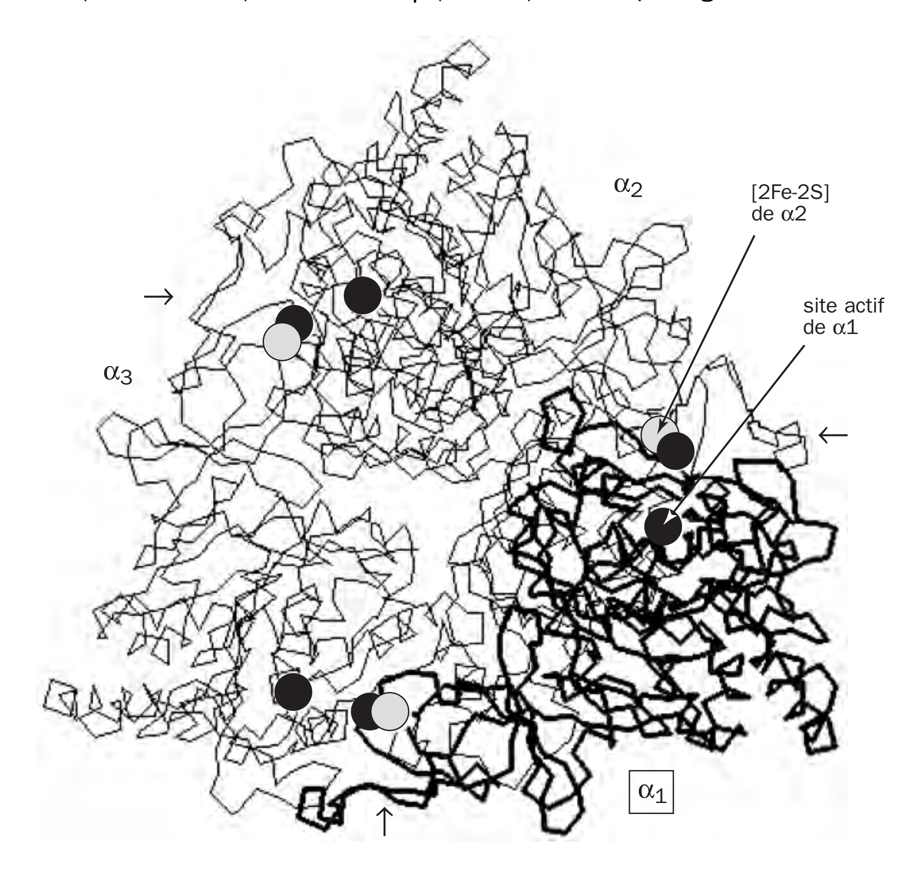
Huit positions ont été soulignées et concernent l'installation de trois Fe dans la chaîne polypeptidique : un noyau [2Fe-2S] du type RIESKE (avec 2 chaînes de cystéine, deux d'histidine) révélé par une séquence consensus, et un ion Fe au centre actif. La disposition est schématisée par un dessin inspiré de PARALES et coll. (1999), les boules noires étant les ions métalliques. L'oxygénase reçoit les électrons un à un par un noyau fer-soufre sur une sous-unité α, qui les communique au site actif d'une sous-unité α voisine, probablement par la connexion histidine-aspartate (H104-D205) suggérée par des expériences de mutagenèse **[40]**. La ligne courbe transversale symbolise la surface de contact entre les deux sous-unités. Le fer du site actif est coordonné par H208, H213, D362, et une molécule d'eau. Il est possible que celle-ci soit assez mobile pour être déplacée par l'arrivée du substrat et d'O_2.



Site actif de la naphtalène dioxygénase et transfert d'électrons

Dans la structure $\alpha_3\beta_3$ de l'enzyme les chaînes α (50 kDa) forment une association triangulaire visible sur le dessin, ainsi que la position du fer (boules noires). On vérifie que chaque fer-soufre est proche du site actif appartenant à la sous-unité voisine. Un autre dessin montre le triangle formé par les trois sous-unités α.

Chacune est représentée par sa chaîne principale et ses trois atomes de fer associés (boules noires). Les chaînes β (20 kDa) ne sont pas figurées.



Le squelette de la chaîne α1 est en trait épaissi pour montrer le rapprochement entre son site actif et la paire d'ions Fe du centre fer-soufre de la sous-unité voisine. Le fer-soufre de chaque sous-unité est ainsi porté par une sorte de prolongement qui vient embrasser la chaîne voisine (en face des petites flèches du dessin). La formation de bras structuraux émis par les replis de la chaîne, certainement indispensables ici au transfert interne des électrons, n'est pas rare dans les protéines oligomériques en général. Elle facilite l'ancrage des chaînes polypeptidiques les unes aux autres et consolide l'ensemble (voir *structure quaternaire**). Les recherches sur cette protéine devront élucider le cheminement des électrons en provenance de l'extérieur en amont, déterminer plus précisément le mode d'insertion des différents substrats et le mécanisme chimique de la réaction. On envisage déjà de modifier par mutation la cavité du site de façon à faciliter l'attaque de nouveaux substrats, et c'est donc une affaire à suivre.

Les bactéries n'ont pas l'exclusivité de la première attaque du naphtalène et analogues. Les champignons sont de la partie mais adoptent une stratégie différente. Une mono-oxygénation forme un époxyde à partir du naphtalène chez *Cunninghamella elegans*, suivie d'une ouverture en naphtol (majoritairement le 1-naphtol). Le

métabolisme ultérieur représente un mode d'oxydation qui rappelle celui qui est pratiqué dans le foie des mammifères **[41]**. Le passage du naphtalène au 1-naphtol est assez commun dans la nature. Il est répandu chez les algues vertes, les diatomées, mais existe aussi chez certains procaryotes (*Bacillus cereus*) **[42]**.

naphtalène → (époxyde) → (H_2O) *trans*-diol → 1,2-dihydroxynaphtalène

(époxyde) → 1-naphtol → → 4-hydroxy-1-tétralone

Attaque du naphtalène par les champignons

La configuration *trans* du dihydrodiol est caractéristique là encore des eucaryotes. Il ne renferme qu'un seul atome d'oxygène provenant d'O_2, car une mono-oxygénase (souvent un cytochrome P450) produit un époxyde, et le deuxième atome d'oxygène est apporté par une molécule d'eau. Le mécanisme chimique observé implique un déplacement NIH (*NIH-shift**). La formation du 1-naphtol a été observée aussi chez des cyanobactéries. Elle mérite ici une mention, car c'est un produit toxique dans l'environnement dont l'apparition fortuite est possible dans diverses biodégradations. Les champignons sont susceptibles de l'oxyder par une laccase, dont l'effet est d'entraîner la formation de polymères brunâtres. Une sorte de détoxification effectuée par le champignon.

8.6 - L'ABONDANCE NATURELLE DES PHÉNOLS

Les phénols sont souvent des produits polluants peu appétissants pour nous, leur élimination facile est généralement souhaitable. Le phénol ordinaire ou hydroxybenzène est un produit majeur de la grande industrie en servant de précurseur pour la fabrication de nombreux ingrédients de la vie moderne. Sa synthèse est réalisée à plus de 90% par peroxydation du cumène et engendre en même temps de l'acétone. Le phénol est aussi un xénobiotique et un polluant toxique à faible taux pour les êtres vivants. Il devient dangereux dans l'eau des rivières dès que sa teneur atteint 1 mg/L. La nature réalise pourtant une grande variété d'ingrédients phénoliques, dont le premier d'entre eux est la *L*-tyrosine. Les composés phénoliques sont particulièrement nombreux dans le règne végétal, et appartiennent à la chimie de la lignine, des tannins et des flavonoïdes. On les trouve aussi dans les lichens et les champignons. Ils font souvent office d'agents protecteurs en aidant les végétaux à se défendre contre les bactéries et les champignons.

Depuis des temps immémoriaux, les organismes aérobies se sont habitués à synthétiser, modifier et dégrader les composés phénoliques naturels à l'aide de stratégies performantes. L'arrivée des xénobiotiques répandus dans l'environnement au cours de l'ère industrielle n'a pas nécessairement créé de "surprise chimique", car les enzymes existantes étaient parfois capables de les prendre pour cible quand leur spécificité était assez élastique. Grâce à une forte sélection et des remaniements génétiques, la microflore a pu s'adapter dans de nombreux cas, et c'est heureux pour nous car sans cela la plupart des phénols artificiels ne seraient pas biodégradables. L'un des procédés d'attaque observés consiste à introduire un deuxième hydroxyle adjacent au premier sur le noyau aromatique, faisant apparaître ainsi la structure d'un **catéchol**. Cette opération est du ressort des oxygénases. Une seule hydroxylation transforme le phénol ordinaire en catéchol [15]. Dans d'autres cas, les chaînes latérales au noyau sont attaquées et raccourcies par oxydation pour être remplacées par un hydroxyle. L'oxygène règne en maître dans toute cette affaire, comme dans cet exemple de conversion du 4-hydroxybenzoate en protocatéchuate (3,4-dihydroxy-benzoate) :

Réaction de la 4-hydroxybenzoate hydroxylase

Le substrat mono-phénolique a été transformé en un dérivé du catéchol. Le noyau aromatique a subi une mono-oxygénation, qui correspond ici à son hydroxylation. Nous retrouvons le principe des mono-oxygénations ordinaires où la source d'électrons auxiliaire, ici NADPH, sert à réduire l'un des deux atomes de la molécule O_2. Dans l'exemple suivant le passage à une structure de type catéchol est un peu plus compliqué et concerne la mono-oxygénation du vanillate sur son méthoxyle (OCH_3). Les deux atomes d'O_2 devraient se répartir entre une molécule d'eau et le formaldéhyde, mais celui-ci peut être pris en charge par le tétrahydrofolate (FH4) à l'aide d'une méthyltransférase **[43]**.

Du vanillate au protocatéchuate

---

15 - *Appelé encore parfois pyrocatéchol, obtenu par distillation du cachou, lui-même tiré d'un Acacia d'Asie méridionale. Le catéchol est un révélateur photographique. Les catéchols en général sont facilement oxydables à l'air et complexent facilement des métaux. Ils entrent dans diverses réactions de polymérisation.*

La déméthylation d'un groupe méthoxyle sur ce principe crée une nouvelle fonction phénolique **[44]**. C'est un mécanisme important dans la nature, car il intervient dans la biodégradation de la lignine et ses dérivés, qui sont généralement très méthoxylés. Quant au protocatéchuate, nous le retrouverons comme intermédiaire extrêmement courant dans de nombreuses transformations.

L'apparition du motif catéchol sur le cycle aromatique a un triple effet. Le premier est de former une structure qui piège efficacement les métaux. Le second est de rendre le cycle beaucoup plus fragile à l'oxydation. Le troisième est d'accroître le caractère hydrophile, donc la solubilité dans l'eau. À cela s'ajoute un quatrième effet : l'oxygène dissous en solution aqueuse réagit spontanément avec les catéchols pour donner des quinones ou des radicaux intermédiaires qui tendent à se polymériser en donnant des produits colorés. Cette réaction lente en milieu acide devient très rapide au-dessus de la neutralité [16].

Précurseur : **1 -** Benzène ; **2 -** Naphtalène ; **3 -** Toluène ; **4 -** Phénol ; **5 -** *o*-Crésol ; **6 -** Acide salicylique ; **7 -** Acide anthranilique ; **8 -** Acide benzoïque ; **9 -** Acide mandélique ; **10 -** *o*-Xylène ; **11 -** Indole.

Le carrefour du catéchol

16 - *Le catéchol en solution brunit rapidement à pH supérieur à 7. L'entité oxydable est probablement l'anion formé par la perte d'un premier proton. Les deux fonctions phénoliques ont comme pKa 9,45 et 12. La présence de groupes attracteurs d'électrons sur le cycle, par exemple de un ou plusieurs atomes d'halogène, tend à abaisser le premier pKa et rend le phénomène d'autant plus rapide.*

Les catéchols sont les cibles des dioxygénases, enzymes qui vont introduire ici deux nouveaux atomes d'oxygène dans la molécule et provoquer l'ouverture du cycle. La figure ci-dessus souligne de façon simplifiée le rôle de carrefour du catéchol dans la dégradation de maints composés phénoliques et non-phénoliques. D'autres molécules sont attaquées pour donner des catéchols substitués, comme nous en verrons des exemples.

Les catéchols ne sont pas les intermédiaires obligatoires du métabolisme des phénols. Par exemple l'acide salicylique indiqué ci-dessus peut aussi être hydroxylé en acide gentisique **[45]**. Le salicylate est un intermédiaire de la dégradation du naphtalène, du *m*-crésol et du 3-hydroxybenzoate **[46]**. Le salicylate est hydroxylable à deux endroits différents et les voies de transformation divergent en fonction des espèces et des conditions de croissance.

salicylate — NADH + H^+, O_2 → NAD^+, H_2O — gentisate

Réaction de la salicylate 5-hydroxylase

Le protocatéchuate est un autre carrefour métabolique engendré à partir du phénanthrène dans un *Pseudomonas* **[47]**. Cet hydrocarbure fait partie des **PAH**, sigle anglo-saxon souvent utilisé dans la littérature internationale pour désigner les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP en français). Des bactéries attaquant le phénanthrène peuvent être isolées des sols souillés par du carburant pour diesel. Là encore existent au moins deux voies de transformation, l'une conduisant au catéchol et l'autre au gentisate.

phénanthrène → 1-hydroxy-2-naphtoate → → → *o*-phtalate → protocatéchuate

L'une des voies du phénanthrène

Nous voyons que les cycles sont entièrement détruits les uns après les autres. L'attaque des hydrocarbures aromatiques polycycliques conduit à un nombre restreint d'intermédiaires clés, dont les plus importants appartiennent aux familles du catéchol, du gentisate et du protocatéchuate. La destruction de ces hydrocarbures converge généralement vers des voies relativement simples malgré l'énorme diversité des composés de départ. Les grandes lignes de ces métabolismes ont été élucidées après les années soixante, et les chapitres suivants permettront de s'en faire une idée.

8.7 - DÉRIVÉS NITRÉS

L'espoir des défenseurs de l'environnement est de voir éliminer le plus rapidement possible les pollutions par divers xénobiotiques, et l'existence d'enzymes capables de faire le ménage dans plusieurs directions fait dresser l'oreille. Les composés nitrés naturels sont rares sauf dans certains antibiotiques. Les nitro-aromatiques de l'environnement proviennent en majorité de l'activité humaine. La combustion incomplète des carburants en libère. Les nitrotoluènes et nitrophénols sont utilisés comme solvants dans l'industrie des colorants et des pesticides, et dans la fabrication d'explosifs du type trinitrotoluène (TNT). Les premiers progrès sur cette question ont d'ailleurs été réalisés par J.C. SPAIN et coll. dans le laboratoire d'une base aérienne militaire en Floride (Tyndall). Le nitrobenzène est une matière première pour la fabrication de l'aniline. Heureusement l'élimination biologique de ces composés est possible et des souches capables de se développer sur eux ont été isolées. Les hydrocarbures aromatiques nitro-substitués ont été longtemps considérés comme réfractaires à l'attaque électrophile des oxygénases par suite du caractère attracteur d'électrons du groupe nitro, qui appauvrit le cycle. Par contre ces mêmes produits, lorsqu'ils sont porteurs en plus d'un substituant polaire, comme dans les nitrophénols ou les nitrobenzoates, sont connus comme facilement biodégradables **[48]**.

La dégradation biologique des nitrodérivés suit au moins quatre stratégies différentes. La première est l'élimination du groupe nitro en nitrite par une mono-oxygénase. La seconde consiste à insérer sur le cycle deux hydroxyles par dioxygénase avec élimination du groupe nitro. Un troisième procédé est la réduction du groupe NO_2 en hydroxylamine et amine, facilitée par la présence de plusieurs substituants nitro. La dernière enfin est une réduction partielle du cycle qui le désaromatise et facilite le départ du groupe nitro [17].

Le **2-nitrotoluène** est un exemple de xénobiotique auquel la nature s'est adaptée, quitte à détourner des enzymes existantes ou à en faire de nouvelles. Nous retrouvons ici la toluène 2,3-dioxygénase de *Pseudomonas putida* F1. Sa souplesse d'action lui fait oxyder tantôt le cycle dans le cas du toluène et du 4-nitrotoluène, tantôt le groupe méthyle du 2- ou du 3-nitrotoluène. Dans le premier cas c'est une dioxygénase, alors qu'elle fonctionne comme mono-oxygénase dans le second. La figure résume la situation **[49]**.

On voit tout de suite que le groupe nitro est ici préservé. Il sera éventuellement éliminé en aval après ouverture du cycle. Le méthyle des 2- et 3-nitrotoluènes (2NT, 3NT) est oxydé. La situation représentée n'est ni unique, ni générale. Par exemple la toluène mono-oxygénase dite xylène mono-oxygénase mentionnée plus haut (celle qui oxyde le méthyle du toluène) n'oxyde pas le 2-nitrotoluène, mais attaque les 3NT et 4NT **[50]**.

---

17 - Une première réduction du cycle fait un dérivé cyclo-diène appelé en chimie complexe MEISENHEIMER.

Oxydation du toluène et des nitrotoluènes

Le 2-nitrophénol (2NP) figure au menu d'une oxygénase qui a été purifiée à partir d'un *Pseudomonas putida* (souche B2) cultivé sur *o*-nitrophénol comme seule source de carbone et d'azote **[51]**.

Le substrat est transformé en catéchol et nitrite par une oxygénase flavinique de 65 kDa, utilisant NADPH comme source d'électrons, et qui est stimulée par les ions Mg^{2+}, Mn^{2+} et Ca^{2+}. La possibilité qu'ont les bactéries d'hydroxyler d'autres substrats porteurs de substituants supplémentaires ne signifie pas qu'elles peuvent s'en contenter pour leur croissance, car leur métabolisme est souvent bloqué en aval en conduisant à une impasse. Le produit terminal est alors évacué dans le milieu où il s'accumule. Ce problème est souvent crucial dans les biodégradations. Il faut non seulement que les enzymes compétentes soient présentes, mais que les intermédiaires formés puissent être traités. À défaut apparaît un métabolisme en cul-de-sac, avec blocage d'enzymes et accumulation d'intermédiaires aux effets toxiques. Quelques entités comme le 2,4-dinitrophénol sont inhibiteurs d'entrée de jeu avant même d'être transformés.

Substrats et inhibiteur de l'o-nitrophénol mono oxygénase

La mono-oxygénase du 2-nitrophénol a la particularité d'être une flavoprotéine, de conception très différente de celle des oxygénases de la section précédente. L'enzyme n'a qu'une seule chaîne et son cofacteur FAD se charge de tout, c'est-à-dire de récupérer les électrons du NADPH, d'activer l'oxygène et d'oxyder la source. Une solution apparemment simple se retrouve dans la mono-oxygénase du 4-nitrophénol. Certaines espèces (*Arthrobacter* JS443 et un *Moraxella*) sont capables de se développer sur 4-nitrophénol comme seule source de carbone **[52]**. C'est encore une oxygénase qui se charge de la première étape ; l'hydroxylation se fait à côté du groupe nitro ou à son niveau. Le résultat est la *p*-benzoquinone ou le 4-nitrocatéchol. Une figure explique l'oxydation du *p*-nitrophénol selon ces deux possibilités, car elles sont assez représentatives de ce qui s'observe sur ce type de substrat.

Oxydation du p-nitrophénol

Plusieurs observations importantes sont à en tirer :

- Les deux modes utilisent une mono-oxygénase pour éliminer le substituant azoté sous forme de nitrite (NO_2^-). Les oxygénases du nitrophénol ou du nitrocatéchol sont de nature flavinique. Elles sont généralement monomériques avec une masse de l'ordre de 65 kDa, contiennent du FAD, et utilisent NADH ou NADPH comme source d'électrons. Le méthimazole, un antithyroïdien, est un inhibiteur. Ces enzymes catalysent parfois plusieurs réactions successives comme chez un *Bacillus*, où le *p*-nitrophénol est transformé en 1,2,4-THB **[53]**.
- Le départ du substituant nitro correspond à la réduction du groupe azoté. Pourquoi ? On peut le comprendre en revenant aux propriétés du noyau aromatique. La nitration du cycle s'effectue presque toujours comme les autres substitutions par une attaque électrophile, ici par l'acide nitrique en présence d'acide sulfurique. Ce dernier agit en quelque sorte comme un déshydratant selon :

$$H_2SO_4 + HNO_3 \longrightarrow HSO_4^- + H_2O + NO_2^+$$

- L'entité attaquante théorique est donc NO_2^+ ou ion nitronium [18]. L'expulsion de celui-ci à partir d'un nitro-aromatique est assez défavorable sur le plan thermodynamique, car il y a préférence pour la réaction inverse. Par contre la sortie du nitrite, qui correspond théoriquement à la réduction de l'ion nitronium, est beaucoup plus favorable. Conséquence : le substrat de l'oxygénase est à la fois hydroxylé, réduit sur l'azote et oxydé sur le cycle pour devenir une quinone. Le compte est bon !
- La quinone est considérée comme un intermédiaire même lorsqu'elle n'a pas été formellement isolée. Sa réduction facile aux potentiels redox physiologiques produit une hydroquinone, soit ici le 1,2,4-trihydroxybenzène (1,2,4-THB) **[54]**. Le cycle d'une hydroquinone est en général facilement rompu par dioxygénase. Dans tous les cas, l'hydroxylation et le départ du groupe nitro rendent l'attaque ultérieure beaucoup plus facile.

Le fait essentiel concernant l'élimination du groupe nitro est sa réduction en ion nitrite. D'autres substituants seront également soumis à réduction, tel le chlore, qui sera évacué sous forme de chlorure. Le dessin montre la dioxygénase du 2-nitrotoluène en catéchol par un *Pseudomonas* (JS42). Par comparaison avec la même réaction sur le benzène, il est facile de voir que l'expulsion du nitrite rend inutile l'intervention d'une déshydrogénase **[55]**.

2-nitrotoluène dioxygénase

Quant au 2,4,6-trinitrotoluène ou TNT, un solide jaune bien connu, c'est un parfait xénobiotique fabriqué par l'homme et qui n'est malheureusement pas utilisé uniquement pour les travaux publics.

Trinitrotoluène et dérivés

18 - *L'acide nitrique concentré est un mauvais agent de nitration parce qu'il y a très peu de nitronium libre. Le contrôle du taux de cet ion en solution règle la vitesse des nitrations. Dans l'acide sulfurique 95% la scission de l'acide nitrique est quasi complète.*

Il contamine accidentellement les sites de fabrication (arsenaux militaires, usines travaillant pour la Défense).Il est toxique pour les algues et les invertébrés, dangereux pour la santé des humains où il peut induire des altérations de la fonction hépatique, des anémies, des irritations de la peau et des effets cancérigènes (en dehors d'autres actions collatérales bien connues !).

En fonction de ce qui précède, on pourrait penser que la destruction biologique du TNT devrait s'effectuer par oxygénations successives faisant partir les groupes nitro sous forme de nitrite. Un *Pseudomonas* s'est montré capable d'attaquer le 2,4-dinitrotoluène **[56]**. Une première transformation catalysée par une dioxygénase à trois composants fait du 4-méthyl-5-nitrocatéchol (l'équivalent du composé I sans l'hydroxyle) et libère du nitrite. Le deuxième substituant nitro est enlevé par une mono-oxygénase. Ces deux étapes sont gouvernées par des gènes plasmidiques autorisant la destruction complète du cycle aromatique. Pour le TNT, c'est autre chose. La dégradation du TNT en aérobiose est souvent plus difficile et moins complète qu'en anaérobiose, et aucune souche bactérienne pure n'a été isolée comme capable de minéraliser entièrement le substrat. L'attaque commence généralement par la réduction de l'un des groupes nitro à l'aide de nitroréductases à NAD(P)H encore mal caractérisées et peu spécifiques. La réduction du groupe nitro se fait à deux électrons en nitroso, puis hydroxylamino (R–N=O, R–NHOH), donnant des intermédiaires réactifs qui sont susceptibles de donner des effets toxiques.

Ces réductions sont favorisées dans le cas des nitro-aromatiques, parce que la résonance entre le groupe nitro et le cycle rend l'atome d'azote électrophile. Or le cycle lui-même est l'objet d'attaques électrophiles qui peuvent être renforcées par un groupe donneur comme un méthyle, ce qui est le cas du toluène. Un méthyle comme celui du toluène est donneur et renforce l'attaque électrophile sur le cycle. Un substituant aminé œuvre dans le même sens. Une situation de conflit oppose donc la réduction du groupe nitro et la dioxygénase du cycle. Lorsque le groupe nitro est seul, il n'arrive pas à faire le poids face à un méthyle, et nous avons vu que l'attaque du 2-nitrotoluène commence effectivement par une dioxygénase. Le départ du groupe azoté en nitrite est une réaction secondaire. Par contre lorsque plusieurs groupes nitro sont présents, l'union fait la force. Dans le TNT qui en a trois, la réduction du premier groupe en fonction aminée tend à être très rapide et fait du 2-amino-4,6-dinitrotoluène(III). La deuxième réduction conduisant au 2,4-diamino-6-nitrotoluène(V) est un peu plus difficile, d'autant que le nouveau substituant aminé tire en sens inverse, et la réduction exigera un potentiel redox plus bas, largement inférieur à – 200 mV. Parmi les germes actifs sont des souches de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. savastanoi* [19]), des *Bacillus*, *Staphylococcus* et autres **[57]**. Les bactéries aérobies parviennent à réduire deux des trois groupes nitro du TNT, la réduction du troisième requiert des anaérobies. La minéralisation du TNT peut s'opérer par compostage et en présence d'une population bactérienne composite.

Les *nitroréductases** sont extrêmement répandues dans les populations bactériennes et catalysent l'étape initiale de l'attaque aérobie des nitro-aromatiques.

19 - Un phytopathogène sur haricot.

Ces enzymes sont souvent flaviniques et utilisent NADH ou NADPH comme source d'électrons. Dans d'autres cas interviennent un cytochrome P450, un cytochrome b_5, la xanthine déshydrogénase ou la quinone réductase. Les nitroréductases diffèrent les unes des autres par leur mécanisme et leur sensibilité à l'oxygène atmosphérique **[58]**. Leur importance pratique dans les biodégradations vient de la nature de leur activité. La réduction des groupes nitrés engendre des intermédiaires radicalaires hautement mutagènes ou toxiques. Ces transformations peuvent se produire dans le tube digestif par la flore intestinale, et c'est pourquoi l'ingestion accidentelle de nitro-aromatiques présente un risque pour la santé. On connaît aussi une dénitration sans oxygénation (par attaque nucléophile avec un hydrure) qui transforme par exemple le TNT en 2,4-dinitrotoluène, ou une réduction sur l'azote conduisant aux composés II, III et V, ou encore une dénitration avec réduction conduisant à IV [20].

En résumé, il existe deux façons d'éliminer les groupes nitro. La première utilise des oxygénases, qui font partir l'azote sous forme de nitrite. La seconde est l'œuvre des nitroréductases, qui engendrent des groupes aminés sur le cycle. Elle est commune en anaérobiose. Qu'en est-il des amines aromatiques ?

NH_2 aniline $\xrightarrow{O_2,\ NADH}$ [H_2N, OH, OH, H] $\rightarrow$ (NH_3) OH, OH

Celles-ci sont généralement biodégradables, en particulier le premier terme qui est l'aniline. Dans le cas d'une attaque par dioxygénase, l'aniline est transformée en catéchol, dont le métabolisme se fait par des voies classiques examinées dans les chapitres suivants.

De multiples souches capables de dégrader l'aniline ont été décrites dans la littérature. Cette propriété est invariablement inductible et déterminée en principe par des plasmides **[59]**. Elle peut se montrer extraordinairement efficace puisqu'une souche de *Delftia* isolée de boues d'épuration a été vue se développer sur l'aniline à 5 g/L **[60]** ! L'aniline dioxygénase fonctionne sur le même principe que les enzymes du benzène et du toluène, avec deux sous-unités et en association avec une réductase et une ferrédoxine. L'ammoniac n'est pas libéré tel quel mais pris en charge par une protéine qui est induite en même temps que la dioxygénase. Ce qui est intéressant dans le cas de ces plasmides de biodégradation de l'aniline, c'est qu'on trouve entre eux à la fois des ressemblances très nettes alors que les espèces bactériennes sont elles-mêmes très différentes. En outre on détecte des éléments d'insertion, et l'on a même reconnu dans un cas le gène de ce qui semble être une transposase. Autrement dit, on a l'impression que les gènes de l'aniline ont été largement répandus par transferts génétiques horizontaux entre des

20 - 2-hydroxylamino-4,6-dinitrotoluène (II), 2-amino-4,6-dinitrotoluène (III), 2-amino-4-nitrotoluène (IV), 2,4-diamino-6-nitrotoluène (V).

bactéries appartenant à des espèces distinctes **[61]**. C'est un mécanisme qui apparaît de plus en plus comme banal.

La biodégradation des dérivés azoïques mérite un détour. Le plus simple dans la série aromatique est l'azobenzène ou C_6H_5–N=N–C_6H_5, découvert en 1834 par MITSCHERLICH. C'était l'amorce de ce qui devait se développer après 1858 (Peter GRIESS) comme l'énorme industrie des colorants d'aniline ou colorants azoïques. Un thème bien connu de chimie classique. Il y a d'abord diazotation en sel d'une amine aromatique ou hétérocyclique par un nitrite en milieu acide, et formation d'un diazonium. Celui-ci réagit à son tour comme électrophile sur un cycle aromatique (généralement en position *para* si le cycle est substitué), la réaction étant dite de copulation. Il y a actuellement près de 3 000 colorants commercialisés dont plus de la moitié sont des azoïques souvent porteurs de substituants halogénés ou de type nitro et amino. Il n'est donc pas étonnant que ces produits se retrouvent dans l'environnement, où ils sont détruits par la microflore ou par des réactions photochimiques. La scission de départ des azoïques est une réduction anaérobie de la liaison entre atomes d'azote. Relativement non spécifique, elle peut s'appuyer sur des flavines réduites. Ainsi des bactéries du genre *Desulfovibrio* utilisent le TNT comme source d'azote. Les trois substituants sont alors réduits successivement en amines, la première réduction étant la plus rapide, la dernière la plus lente. Le produit formé est le triaminotoluène. Au contraire la destruction des produits de rupture qui sont des amines aromatiques, est faite de préférence en milieu oxygéné **[62]**. En somme le cadre le plus favorable à l'élimination des azoïques est une épuration par anaérobiose suivie d'oxygénation. Cette opération peut démarrer dans une installation de *type UASB**, où s'opèrent une méthanisation et différentes actions anaérobies.

Les méthanogènes collaborent au démarrage du processus, mais il convient de préciser que leur action est gênée par les nitrodérivés. Un aromatique nitré est environ 500 fois plus toxique à dose égale que le produit aminé correspondant dans les mêmes conditions. L'élimination des groupes nitro est donc cruciale. Ils ne doivent pas excéder 0,1 mM en ordre de grandeur. Les meilleurs résultats ont été obtenus sur granules méthanogènes supplémentés avec une source d'électrons comme le glucose. On sait que la méthanisation de composés organiques variés, voire des xénobiotiques, est favorisée en population mixte comportant des méthanogènes, des acétogènes et autres germes anérobies. Un schéma propose le métabolisme probable d'un colorant, le Mordant Orange 1.

Dégradation d'un azoïque

L'expérience a montré que la minéralisation de l'un des intermédiaires, l'acide 5-aminosalicylique, était réalisée dans les conditions de la méthanisation. Cette propriété est bienvenue, car le 5-aminosalicylate est précisément répertorié comme polluant des eaux en zone industrielle. L'élimination de la *p*-phénylène diamine en milieu anaérobie reste problématique. Sa dégradation doit se poursuivre en aérobiose. Tous ces différents produits sont fortement indésirables dans l'eau de consommation à cause de leurs potentialités plus ou moins cancérigènes. Un métabolisme de colorants azoïques a été observé seulement en aérobiose. Un grand nombre d'essais ont été publiés dans la littérature. Par exemple, le *p*-amino-azobenzène a été dégradé par une culture mixte de *Bacillus subtilis* et *Stenotrophomonas* (*Pseudomonas*) *maltophilia* **[63]**.

Revenons au cas général des dérivés nitrés. Le choix entre oxygénation ou réduction d'un groupe nitro dépend de la nature des substituants sur le cycle. Dans les dérivés nitrés du toluène, la réactivité du cycle est influencée par le groupe méthyle. Dans les nitrophénols, la réduction d'un groupe nitro isolé est facilitée par la présence de chlore et d'hydroxyle, qui agissent en sens contraire d'un méthyle. Les trois composés suivants sont alors réduits, consommés et minéralisés comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie par différents germes :

I - 2-chloro-4,6-dinitrophénol par *Rhodococcus erythropolis* **[64]**
II - 4-chloro-2-nitrophénol par *Pseudomonas* N31 (souche construite) **[65]**
III - 2-chloro-5-nitrophénol par *Ralstonia eutropha* JMP134 **[66]**

Les champignons opèrent différemment. Des études ont été conduites en Belgique avec *Phlebia radiata*, un basidiomycète lignolytique de la *pourriture blanche** **[67]**. L'étape initiale est une réduction par des réductases intracellulaires ne faisant pas partie de l'appareil lignolytique [21], mais la dégradation ultérieure s'opère par le jeu d'une **peroxydase** extracellulaire dite MnP qui nécessite des ions manganèse, et détruit rapidement les dérivés aminés nés du TNT ou du dinitrotoluène. Il se forme des quinones. Le principe s'applique aussi à d'autres espèces lignolytiques comme *Phanerochaete chrysosporium*. Cette perspective est offerte par les champignons là où les bactéries semblent perdre un peu leur latin. Le mécanisme de ces peroxydases sera aperçu à la fin du chapitre 13.

En conclusion, l'attaque des nitrodérivés n'est pas l'affaire exclusive des organismes aérobies. L'azote est éliminé sous forme de nitrite ou réduit en amine. La disparition des nitrodérivés est donc réalisée surtout par des populations microbiennes mixtes ou au cours d'une succession d'actions enclenchées initialement par des anaérobies. Plusieurs solutions métaboliques plus ou moins complexes semblent exister en anaérobiose et n'ont pas toutes été répertoriées.

---

21 - C'est-à-dire qui permet l'attaque de la lignine, essentiellement fondée sur des peroxydases extracellulaires.

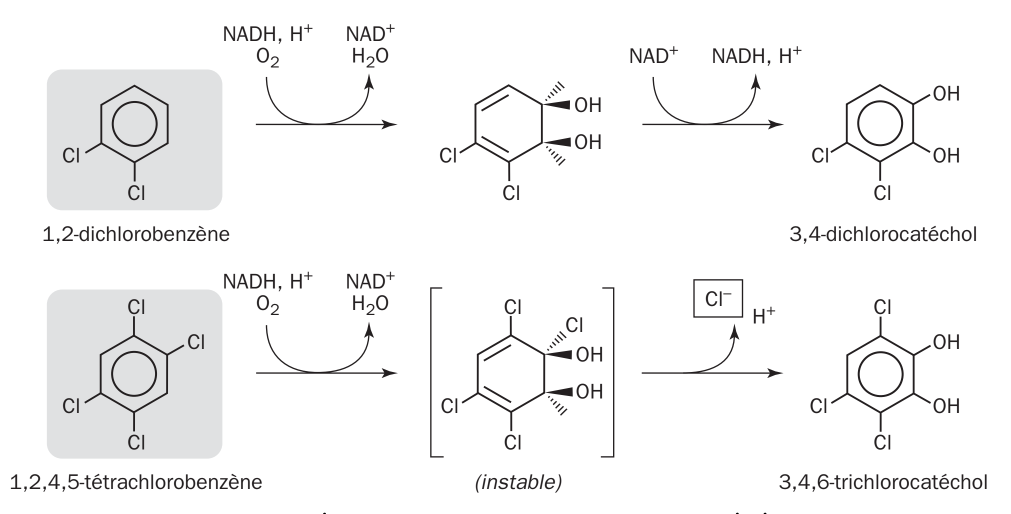
8.8 - HALOAROMATIQUES

Les dérivés aromatiques porteurs d'un ou plusieurs atomes d'halogène sont en général des xénobiotiques, donc des entités pouvant être récalcitrantes. Heureusement là encore, l'intervention initiale d'une oxygénase facilite la tâche. L'accent sera mis sur l'action des bactéries. Une oxygénation effectue la première attaque. Il y a deux possibilités, La première est une oxygénation du cycle à côté de l'halogène, qui sera éventuellement éliminé au cours des étapes ultérieures. Un deuxième mode consiste à éliminer directement le chlore en ion chlorure par oxygénation.

La présence d'un halogène sur le cycle aromatique tend à augmenter la polarité de la molécule, évaluée par la mesure du coefficient de partage P entre les phases n-octanol/eau.

Composé	*log P*	*Composé*	*log P*	*Composé*	*log P*
Benzène	2,13	1,4-Dichlorobenzène	3,38	Biphényle	3,86
Fluorobenzène	2,27	Hexachlorobenzène	6,18	Phénol	1,46
Chlorobenzène	2,84	Aniline	0,98	4-Chlorophénol	2,39
Bromobenzène	2,99	Ac. benzoïque	1,87	2,4-Dichlorophénol	3,08
Iodobenzène	3,25	Ac. phénoxyacétique	1,26	Pentachlorophénol	5,01

Nous choisirons ici la dégradation des produits chlorés. Les deux possibilités sont comparées par des exemples. Un dichlorobenzène est transformé en dichlorocatéchol, et le tétrachlorobenzène est changé en trichlorocatéchol avec départ de chlorure.

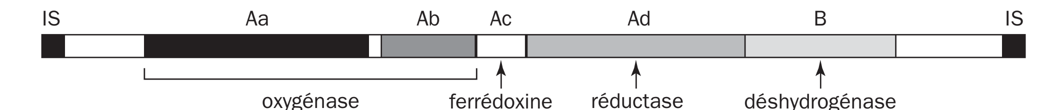


Dioxygénation du cycle aromatique halogéné

La différence saute aux yeux tout de suite. La dioxygénase sans déchloration fabrique un *cis*-dihydrodiol classique. Une déshydrogénase complète l'action et rétablit l'aromaticité en formant un catéchol, dont le cycle sera rompu ultérieurement. Dans le deuxième cas, une déshydrogénase est inutile car une paire d'électrons permet de libérer l'ion chlorure. Or toute réduction du chlore appelle en compensation une oxydation ailleurs. L'élimination de l'halogène est assimilable à une dismutation interne de la molécule : une partie s'oxyde (le cycle), l'autre reçoit les électrons (l'halogène).

La première dioxygénase est pratiquée sur mono- ou dichlorobenzènes par la souche P51 d'un *Pseudomonas* qui est capable de se développer sur ces produits **[68]**. Cette propriété est conférée par un plasmide transmissible (pP51) qui contient un opéron *tcbAB* capable de diriger la transformation des chlorobenzènes en un catéchol. Un deuxième opéron *tcbCDEF* et un gène régulateur *tcbR* concernent le métabolisme du catéchol en aval et nous le laisserons de côté. Dans le premier opéron (*tcbAB*), la partie *tcbA* est constituée en fait de quatre gènes. Les deux premiers codent pour les deux sous-unités de la dioxygénase (une grosse sous-unité qui contient le site actif et une plus petite), un troisième code pour une ferrédoxine et le quatrième pour une réductase active sur NADH.

Chose intéressante, le premier opéron est placé sur le plasmide dans un transposon dont voici la disposition entre deux *IS**. On remarque la disposition de *tcbAB* (*tcbA* étant subdivisé en quatre gènes), avec les différentes parties qui dirigent la transformation aboutissant au catéchol.



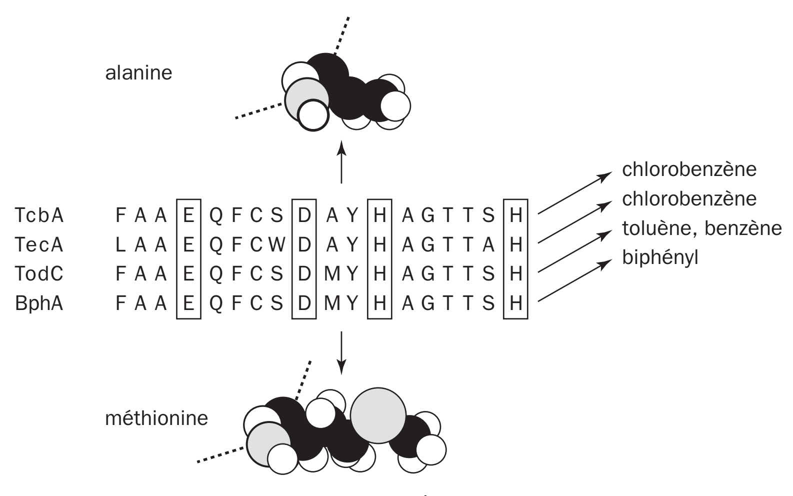
L'acquisition du plasmide par ce *Pseudomonas* et l'insertion du transposon ont été visiblement déterminantes. La propriété de croître sur le dichlorobenzène est typiquement le résultat d'un transfert génétique horizontal. L'ensemble a été cloné chez un colibacille. L'oxygénase s'attaque également au toluène, au naphtalène et au biphényle.

Le deuxième exemple est celui de *Burkholderia* PS12 capable de déchlorer un tétrachlorobenzène **[69]**. La biodégradation aérobie d'un aromatique chloré est en principe d'autant plus difficile qu'il y a davantage d'atomes de chlore sur le noyau. Les composés très chargés en chlore peuvent donc être récalcitrants et persister longtemps dans l'environnement. L'attaque est basée ici sur une dioxygénase qui déchlore partiellement le 1,2,4,5-tétrachlorobenzène **[70]**. On ne connaît actuellement aucune oxygénase active sur le penta- ou hexachlorobenzène, qu'on peut donc soupçonner d'être particulièrement rémanents. L'hexachlorobenzène a derrière lui une sinistre réputation. Ce fongicide utilisé pour les blés de semence a causé entre 1956 et 1961 de graves accidents en Turquie, et plus tard en Arabie. Le produit très rémanent et concentré par la chaîne alimentaire s'était retrouvé dans le pain, et une grave intoxication a provoqué la mort de plusieurs centaines de

personnes par atteinte cutanée et neurologique. Le produit passait dans le lait des jeunes enfants, et laissait de graves séquelles chez les survivants.

Revenons à la souche P51 dont la dioxygénase transforme le chlorobenzène en dihydrodiol intermédiaire sans déchloration. Ce système ressemble à celui de la toluène dioxygénase. Les gènes sont groupés et codent pour l'habituelle trilogie réductase-ferrédoxine-dioxygénase. Le complexe contient un cation métallique Fe^{2+} et son action n'est pas très sélective, car des aromatiques méthylés comme le toluène sont également transformés. De façon générale, ces dioxygénases sont variées dans la nature et forment quatre sous-classes en fonction des homologies de séquences et de l'ordre des gènes. Cette situation a conduit des auteurs à s'interroger sur l'évolution de ces enzymes et à faire une recherche systématique pour celles qui ont telle ou telle spécificité. Une méthode astucieuse est celle de JOO et coll. **[71]**. Elle consiste à examiner l'action des oxygénases exprimées par différents mutants, et chaque produit hydroxylé formé à partir d'un substrat aromatique est traité par une peroxydase qui a pour effet de créer des entités colorées ou fluorescentes dotées chaque fois d'un spectre caractéristique. On devrait donc disposer rapidement d'une importante masse de données.

Puisque ces différentes dioxygénases semblent fonctionner à peu près sur le même modèle tout en admettant une gamme différente de substrats, la question qui se pose est celle du mécanisme qui oriente l'attaque sur tel ou tel aromatique, par exemple pourquoi un chlorobenzène est oxydé et non pas le toluène et vice-versa. Ce déterminisme est forcément réglé par la séquence. L'étude de BEIL et coll. sur la dégradation du tetrachlorobenzène apporte un éclairage nouveau **[72]**. La dioxygénase **TecA** de *Burkholderia* présente une forte homologie avec la toluène dioxygénase (**TodC**) de *Pseudomonas putida*. La première oxyde comme on sait des benzènes chlorés, mais n'attaque pas le benzène. La seconde est active sur toluène et benzène, mais son activité sur chlorobenzène est quasi nulle. Les séquences correspondantes sont recombinées par génie génétique, de façon à remplacer un morceau d'une séquence par le fragment homologue venant de l'autre séquence. Les gènes obtenus sont donc des patchworks à partir de deux origines. Ils ont été clonés et exprimés dans *E. coli*. La protéine obtenue est une chimère conservant l'activité d'une dioxygénase, et la gamme des substrats utilisés est analysée. Le résultat dépend du fragment qui a été remplacé. Tantôt l'enzyme continue à se comporter comme la TecA de départ, tantôt c'est une toluène dioxygénase. Il existe donc une portion critique pour régler la spécificité. Elle est située au niveau de la portion qui lie le fer et nous y avons déjà fait allusion. Voici l'alignement local entre 4 séquences. TcbA est l'enzyme de *Pseudomonas* P51 qui attaque le chlorobenzène et le dichlorobenzène. TecA et TodC sont les protéines dont les gènes ont été recombinés avec celui de *Burkholderia* PS12, comme expliqué ici. BphA est la biphényle dioxygénase d'un *Rhodococcus* **[73]**. Les substrats attaqués sont indiqués à droite. TecA attaque le chlorobenzène, alors que TodC dégrade le toluène et le benzène. L'examen de plus d'une trentaine de « chimères » et des remplacements d'acides aminés déterminés dans TodC ont révélé l'action déterminante d'une position dans la région indiquée.



Une position déterminante

Cette position est donc dans la région qui lie le fer. Les acides aminés essentiels, E, D, H, sont conservés et entourés d'un cadre. Entre D et H le remplacement de l'alanine par un résidu plus encombrant, qui est la méthionine, supprime l'activité sur benzènes chlorés. Inversement le remplacement de la méthionine par l'alanine dans TodC crée une nouvelle enzyme dont l'action va du toluène au benzène (ce que ne fait pas le TodC d'origine) et va jusqu'au tétrachlorobenzène. Le conservatisme de ce petit morceau de séquence enroulé autour du fer obéit très certainement à des critères structuraux très stricts qui doivent veiller en particulier à lier simultanément le substrat et O_2. On voit que le remplacement de la sérine (S) par un tryptophane (W) beaucoup plus encombrant ne tire pas à conséquence. Or la présence d'un tryptophane sera importante pour les études futures par sa fluorescence, en servant de révélateur des changements structuraux dans l'enzyme au cours du cycle catalytique. Des effets un peu plus compliqués s'observent quand on touche à d'autres portions de la séquence, mais concernent probablement l'organisation structurale de la protéine. Les résultats les plus intéressants sont les effets d'une modification même minime dans la région du site actif sur la sélectivité du système.

En somme l'étude de ces différentes protéines apporte des données utiles sur deux fronts, pour nous aider à éliminer de l'environnement des produits gênants et pour mieux comprendre les critères structuraux qui règlent l'activité catalytique. Le génie génétique permet d'obtenir de nombreuses mutations à la demande, mais la microflore du sol et des eaux est le siège de transferts génétiques horizontaux par plasmides et transposons qui facilitent l'apparition au hasard de souches adaptées.

8.9 - LE BENZOATE ET LES HALOBENZOATES

L'acide benzoïque a de multiples applications chimiques dans l'industrie et s'utilise parfois comme agent protecteur des denrées alimentaires pour retarder la croissance des micro-organismes. Il est cependant un excellent substrat de croissance pour une foule de germes. Par exemple *Ralstonia eutropha* se développe vigoureusement sur benzoate, tout en ignorant le glucose (il lui préfère le gluconate). Cette espèce Gram-négative du sol est un aérobie rustique dont l'optimum de température est vers 30°C, qui peut aussi oxyder l'hydrogène et croître en autotrophie, donc sur CO_2. C'est donc un chimio-litho-autotrophe.

La biodégradation de maints aromatiques porteurs d'un substituant carboné se fait par oxydation latérale et apparition d'un carboxyle. Le benzoate est alors un intermédiaire extrêmement important dans la nature. Nous savons déjà que l'acide benzoïque résulte de l'oxydation du toluène sur son groupe méthyle. Il est engendré aussi par la biodégradation du biphényle et des biphényles chlorés, ingrédients dont l'élimination dans l'environnement peut poser un problème épineux. Tout dépend du nombre d'atomes de chlore de la molécule et leur répartition. Commençons par le plus simple avec le benzoate et ses dérivés.

Que devient le benzoate ? Il est attaqué de deux façons différentes. La première est une mono-oxygénation du cycle en *ortho*, *méta* ou *para*, et le 4-hydroxybenzoate est oxygéné à son tour en protocatéchuate. La seconde est une dioxygénation donnant un *cis*-dihydrodiol, qui sera décarboxylé par la suite : c'est la dégradation la plus commune des halobenzoates.

Les deux voies du benzoate

Ces deux voies sont connues depuis longtemps et peuvent coexister dans le même germe bactérien **[74]**. La dioxygénation la plus commune est représentée par la ligne du bas conduisant au catéchol. Les transformations sont généralement toutes inductibles. Par exemple le benzoate présent dans le milieu induit les enzymes de sa propre transformation, mais un intermédiaire comme le *cis,cis*-muconate peut être le véritable inducteur. Cette question sera expliquée dans le chapitre suivant. La formation d'un *cis*-dihydrodiol et la réaromatisation par une déshydrogénase est

donc la stratégie banale qui est celle de l'attaque du benzène. Nous la retrouvons avec le *o*-phtalate et le téréphtalate. Le premier est un agent plastifiant très répandu, le second est utilisé pour la confection de matières plastiques appelées PET (notamment dans les bouteilles plastiques). Le protocatéchuate est dans les deux cas l'intermédiaire clé dont le métabolisme sera détaillé au chapitre 9.

o-phtalate

téréphtalate

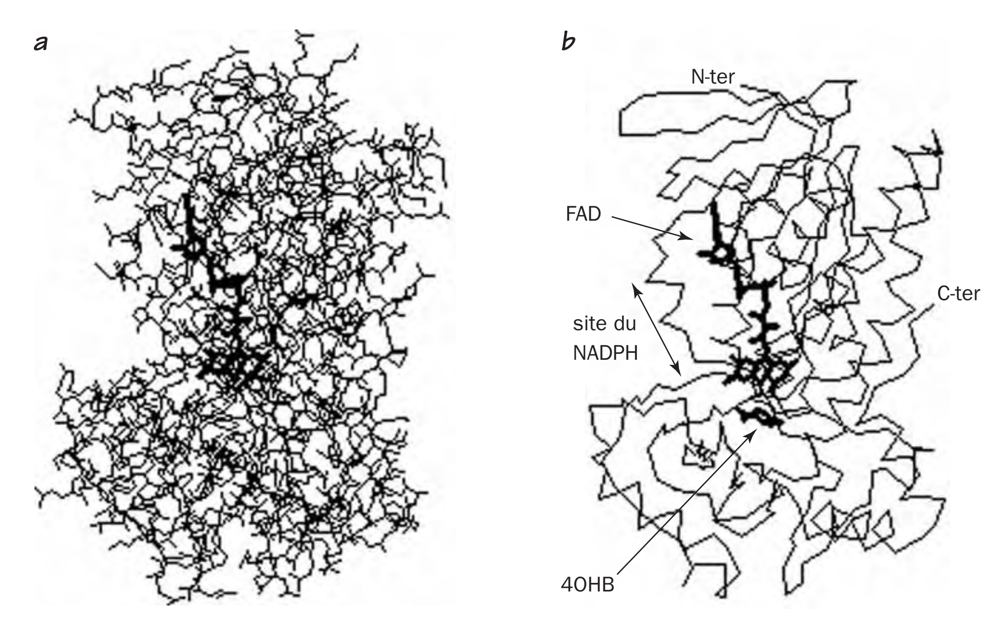
protocatéchuate

Les phtalates

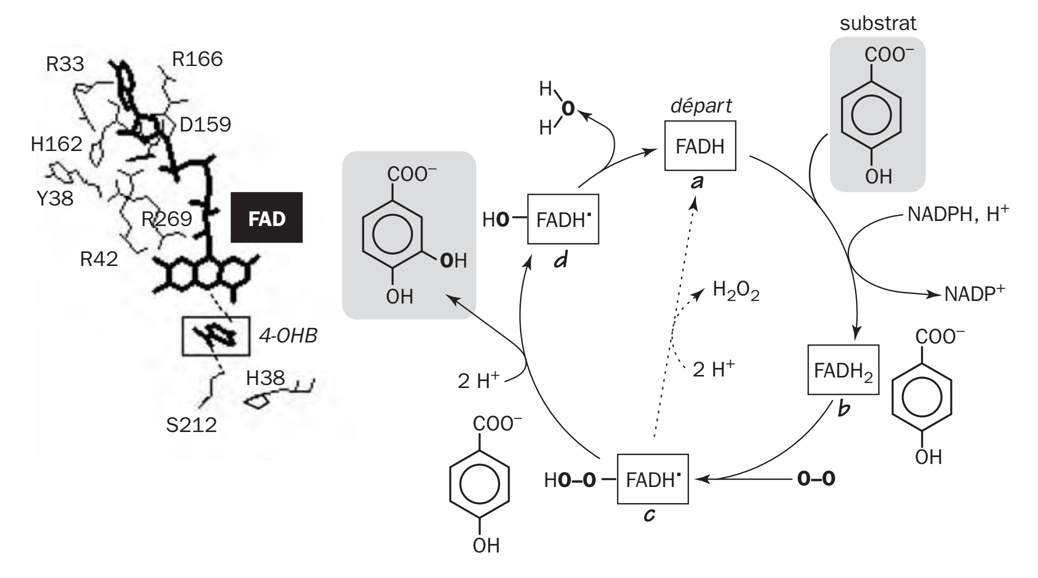
Les analogies avec les métabolismes du benzène, du naphtalène et du benzoate s'expliquent facilement parce que les outils sont similaires. La 4,5-phtalate dioxygénase de *Pseudomonas cepacia* reçoit ses électrons d'une réductase à FMN comportant un noyau [2Fe-2S] classique **[75]**, et la dioxygénase proprement dite a un noyau [2Fe-2S] de type RIESKE, dans un environnement rappellant celui de la naphtalène dioxygénase **[76]**.

Nous passons à un mécanisme différent qui est aussi une transformation importante dans la nature. Elle est représentée par l'hydroxylation du 4-hydroxybenzoate. Il y a deux modes dont un seul sera représenté pour simplifier. L'enzyme la plus connue est flavinique. Elle diffère par conséquent des oxygénases complexes à deux ou trois composants, car une seule protéine monomérique se charge ici d'oxyder à la fois le NAD(P)H et le substrat. L'hydroxylation conduit au protocatéchuate. On connaît la structure détaillée de la 4-hydroxybenzoate hydroxylase de *Pseudomonas fluorescens* ainsi que son mécanisme réactionnel probable **[77]**. L'enzyme est très spécifique, utilise NADPH et catalyse l'oxygénation par sa flavine (FAD). Chose curieuse, une levure, *Candida parapsilosis*, utilise aussi une hydroxylase flavinique pour traiter le 4-hydroxybenzoate, mais le mécanisme est différent car le nouvel hydroxyle est greffé à la place du carboxyle et produit du 1,4-dihydroxybenzène ou hydroquinone **[78]**. L'enzyme est beaucoup moins spécifique que la précédente et fonctionne au mieux avec NADH.

La 4-hydroxybenzoate hydroxylase de *Pseudomonas fluorescens* a une seule chaîne de 391 acides aminés et une molécule de FAD. Le substrat se loge dans une poche étroite contre la flavine. En ***a***, modèle "fil de fer" de la molécule où sont représentées toutes les liaisons autres que celles qui portent les atomes d'hydrogène. En ***b*** n'ont été conservées que les liaisons de la chaîne principale. Les positions du FAD et du substrat (4OHB) sont indiquées en trait épaissi.



Cette enzyme a permis d'élucider une mine de questions fondamentales. La première est : pourquoi l'enzyme est-elle spécifique de NADPH et non pas de NADH ? Cette discrimination est commune dans les déshydrogénases et réductases, et s'appuie généralement sur le groupe phosphate supplémentaire en 2' sur le ribose, une position anionique et encombrante. L'analyse structurale permet de prévoir quels sont les résidus impliqués, les conclusions ont été vérifiées par mutagenèse par EPPINK et coll. **[79]**.



Site actif et cycle de la 4-hydroxybenzoate hydroxylase

Les résidus Y33, Y38 et R42, indiqués sur le croquis, sont à la fois exposés au solvant et proches du phosphate en 2' du NADP. Le remplacement de ces positions a permis de montrer que l'enzyme pouvait fonctionner alors de préférence avec NADH. La flavine est encastrée dans la protéine et son verrouillage en place est assuré par un segment de séquence allant de 159 à 162. Une autre question fondamentale porte sur l'oxydoréduction entre NADPH et FAD, et le fonctionnement de la flavine dans l'oxygénation, puisque l'enzyme est une mono-oxygénase faisant tout par elle-même sans réductase ni ferrédoxine.

À gauche est symbolisé le FAD dans son environnement au sein du site actif. Le substrat (4-OHB) s'installe au contact direct de la flavine. Le cycle, à droite, montre que l'enzyme munie de FAD (E_{ox}) reçoit le substrat, deux électrons et l'oxygène, dans cet ordre. Apparaît alors un stade peroxyde (O_2^{2-}), qui précède la scission de la liaison O–O, avec hydroxylation du substrat en protocatéchuate. L'oxygène restant est lié à la flavine, qui s'en débarrasse sous forme d'une molécule d'eau. Les flavines sont des cofacteurs extraordinaires, capables d'intervenir dans des oxydo-réductions variées à un ou deux électrons, et de participer à la chimie du dioxygène. Nous avons ici l'occasion de nous faire une idée sur le principe de leur intervention. La partie active du cofacteur est le noyau isoalloxazine représenté en détail, la lettre R symbolisant la chaîne latérale (ribityl-adénosine-pyrophosphate) du FAD. Les lettres a, b, c et d désignent les 4 étapes du cycle.

Le stade essentiel de cette chimie particulière, symbolisée de façon simplifiée par le cycle du FAD, est l'hydroperoxyde en ***c***. Le FAD, réduit en $FADH_2$ (***b***), réduit à son tour O_2 en O_2^{2-}, pour donner théoriquement l'équivalent de $FADH^0$-O_2H, qui est l'hydroperoxyde. La capacité des flavines réduites de se lier à l'oxygène, à la position désignée par 4a selon la nomenclature internationale, est une propriété caractéristique des flavines dans les oxydases et oxygénases.

(hydroperoxyde)

Cycle simplifié du FAD

Les données actuelles suggèrent que les populations microbiennes s'adaptent assez bien à la dégradation des halobenzoates. Cette adaptation se fait là encore à la faveur de modifications d'enzymes existantes par mutation, recombinaison et transferts génétiques horizontaux. Le système étudié par le groupe de Lingens est un exemple significatif. Il s'agit d'une 2-halobenzoate-1,2-dioxygénase de *Pseudomonas cepacia* 2CBS et *P. aeruginosa* **[80]**. Une figure indique la réaction, où X désigne un halogène.

2-Halobenzoate dioxygénase

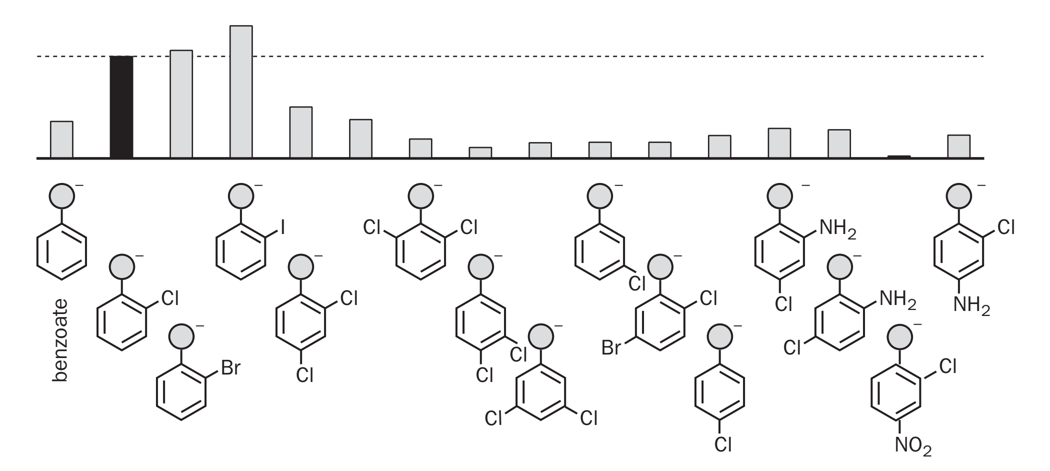
Le diol intermédiaire indiqué n'a pas été isolé et sa structure est donc hypothétique. Nous savons qu'aucune déshydrogénase n'est nécessaire pour refaire le cycle aromatique du catéchol puisque le chlore est spontanément expulsé en chlorure. Dans le cas du benzoate qui est également substrat (X remplacé par H), le produit est un diol et le passage au catéchol exige une déshydrogénation. L'enzyme accepte une gamme étendue de substrats. Sur le tableau suivant les exemples ont été tirés de l'article de FETZNER et coll. Les cercles représentent la fonction carboxylate. La hauteur des rectangles permet de comparer l'activité obtenue avec celle qui est mesurée sur le 2-chlorobenzoate (rectangle noir). Les substrats porteurs d'un seul substituant en ortho sont dioxygénés en catéchol à l'exception du 2-méthylbenzoate qui est transformé en o-crésol. Les auteurs n'ont pas caractérisé tous les produits qui résultent toutes les fois d'une dioxygénation. Fait exception le cas du 4-hydroxybenzoate, qui est transformé en hydroquinone.

Spécificité de l'halobenzoate dioxygénase de P. cepacia

Cette enzyme est avec la benzoate 1,2-dioxygénase de *Pseudomonas arvilla* le chef de file d'une famille d'hydroxylases contenant seulement deux composants, et non pas trois comme la dioxygénase du benzène, du toluène et du naphtalène. Les deux composants sont une réductase à FMN ou FAD avec un centre [2Fe-2S], et une oxygénase de type $\alpha_2\beta_2$ ou $\alpha_3\beta_3$ fonctionnant avec Fe(II). Il n'y a pas de ferrédoxine. En fait c'est comme si la réductase avait incorporé celle-ci dans sa structure. Il y a une ressemblance intéressante entre cette 2-halobenzoate dioxygénase peu sélective et la dioxygénase spécifique du benzoate. La ressemblance porte sur

la séquence et sur les propriétés. L'enzyme du benzoate n'a que 11% d'activité relative avec un chlore en ortho, 1% seulement avec un méthoxyle, 25% lorsque c'est une fonction amine (anthranilate). Le tableau précédent indique des rapports très différents. À l'évidence la dioxygénase des halobenzoates accepte plus facilement un atome ou un groupe encombrant à la position *ortho*. On peut imaginer que c'est une adaptation résultant d'une mutation. La sélection naturelle dans les sols aurait pu porter sur les bactéries armées pour consommer le méthoxybenzoate, qui est proche des produits de dégradation de la lignine. La protéine fait partie de celles qui sont suffisamment complaisantes pour s'intéresser par hasard à nos xénobiotiques. Les enzymes peu éclectiques sont évidemment les armes recherchées de la bioremédiation !

S'agit-il d'un modèle général pour l'attaque des benzoates halogénés ? La réponse est négative. ROMANOV et HAUSINGER ont étudié chez *Pseudomonas aeruginosa* **[80]** souche 142 une dioxygénase à trois composants (la ferrédoxine est à l'état séparé). Nous retombons sur l'architecture de la toluène dioxygénase. Là encore la spécificité est élargie à une gamme de substrats représentés par un nouveau tableau avec les mêmes conventions que plus haut. On voit que le 2-iodobenzoate est ici un excellent substrat. Il est dommage que les auteurs n'aient pas testé les mêmes composés que dans l'étude précédente, notamment les dérivés fluorés.



Spécificité de l'halobenzoate dioxygénase de P. aeruginosa

En résumé toutes ces dioxygénases contribuent au nettoyage de l'environnement par une très grande diversité et leur faculté d'attaquer une gamme plus ou moins étendue de substrats, mais il s'en dégage néanmoins quelques règles communes simples qui laissent penser qu'elles dérivent toute d'un modèle commun. C'est le manque de sélectivité de ces enzymes, certainement présentes depuis des millions d'années pour recycler des composés naturels, qui leur permet de s'accommoder des xénobiotiques nés de l'activité humaine.

8.10 - AROMATIQUES FLUORÉS

Le fluor est un élément abondant dans la nature où il entre dans la composition de divers minéraux, dont la fluorine (CaF_2), la cryolithe et l'apatite. À part sa présence dans les squelettes et les dents, le fluor est peu utilisé par les êtres vivants et ne se rencontre guère que dans une dizaine de constituants, comme le fluoroacétate, des acides gras fluorés, la 4-fluorothréonine. Sans doute la nature évite-t-elle le plus réactif de tous les éléments, qui ne fut découvert qu'en 1886 par MOISSAN. La présence des organofluorés dans l'environnement vient principalement de l'industrie humaine qui a engendré une immense variété de composés carbonés contenant du fluor, comme agents thérapeutiques ou agrochimiques, dans les revêtements protecteurs, les lubrifiants, les solvants et liquides réfrigérants. La liaison carbone-fluor est particulièrement stable par suite de son énergie élevée (466 $kJ.mol^{-1}$), mais le fluor en place dans une molécule organique est assez inerte chimiquement et difficile à déloger par les réactions biologiques courantes. Les composés perfluorés comme les perfluoroalcanes fabriqués après 1970 sont réfractaires à toute biodégradation. L'opinion publique a commencé à s'émouvoir quand il fut constaté l'action néfaste des gaz fluorés volatils du type fréon sur la couche d'ozone.

La présence d'un atome de fluor sur un cycle aromatique engendre un encombrement stérique plus faible que celui d'un autre halogène comme le chlore, mais reste plus volumineux qu'un hydrogène et ressemble davantage à un hydroxyle. Les mécanismes de déshalogénation des fluoroaromatiques ressemblent à ceux que nous avons rencontrés dans le cas du chlore, mais avec des caractères particuliers dus aux propriétés de l'halogène. Les cas les plus étudiés concernent les dérivés monofluorés du benzoate.

L'enlèvement du fluor se fait toujours sous forme d'ion fluorure, soit pendant l'ouverture du cycle, soit ultérieurement. Le cas le plus simple est celui du 4-fluorobenzoate traité par un *Aureobacter*. Une déshalogénase remplace le fluor par un hydroxyle, et la 4-hydroxybenzoate hydroxylase génère le protocatéchuate **[81]**. Le substrat induit toute la série des enzymes qui métabolisent le benzoate. On peut supposer logiquement qu'il est transformé selon la même voie que le benzoate, mis à part la déshalogénase initiale.

COO^- / F — 4-fluorobenzoate —(H_2O → HF)→ COO^- / OH —(O_2, NADPH, H^+ → $NADP^+$, H_2O)→ COO^- / OH / OH → voie *ortho*

Nous savons qu'il y a deux modes de dégradation du benzoate. L'un d'eux engendre du 4-hydroxybenzoate comme ici, le second décarboxyle et produit du catéchol.

Si ce même principe était appliqué au 4-fluorobenzoate, le produit formé serait du 4-fluorocatéchol. L'élimination immédiate de l'halogène évite cet inconvénient.

4-fluorocatéchol

Pourquoi ? Les catéchols sont oxydables spontanément en présence d'oxygène de l'air. Cette auto-oxydation génère des radicaux libres toxiques pour les cellules. Elle est d'autant plus rapide que le cycle porte des substituants attracteurs d'électrons, et elle s'accélère à pH alcalin. Le phénomène est particulièrement accusé en présence de substituant fluoré.

La dégradation biologique d'un substrat est parfois vouée à l'échec quand les transformations conduisent à un intermédiaire réactif toxique dont l'effet est d'inhiber ou de bloquer totalement toute transformation ultérieure. Nous en avons un exemple avec le 3-fluorobenzoate. La dioxygénase classique du cycle benzénique offre deux possibilités, c'est-à-dire l'apparition transitoire de deux *cis*-dihydrodiols différents conduisant aux deux directions **a** et **b** du schéma suivant. Dans la voie **a** après décarboxylation et réaromatisation se forme du 3-fluorocatéchol. La proximité du fluor avec la fonction catéchol favorise le mode d'ouverture appelé *méta*. La nouvelle dioxygénase provoque la formation d'un fluorure d'acide réactif qui se soude avec le site actif de l'enzyme et provoque son inactivation définitive. C'est donc un cas d'inhibition "suicide". Dans la voie **b**, le 4-fluorocatéchol formé ne produit pas un inhibiteur suicide, mais sa dégradation n'interviendra que si l'enlèvement ultérieur de l'halogène est réalisable.

3-fluorobenzoate

(blocage)

(voie méta ou blocage)

Que ce soit en **a** ou en **b**, une défluoration initiale au cours de la première dioxygénase n'a pas lieu. Peut-elle s'observer dans d'autres cas ? La réponse est oui si la fonction carboxylique est remplacée par un méthyle. Le substrat est alors le 3-fluorotoluène. Un *Pseudomonas*, souche T12, se développe sur 3-fluorotoluène comme seule source de carbone et d'énergie **[82]**. L'enzyme catalysant la dioxygénase n'est autre que la toluène dioxygénase. Le taux de la défluoration initiale

dépend du substituant qui est en *ortho* par rapport au fluor. Il est de 90% avec un fluor (1,2-difluorobenzène), moindre avec un brome ou un iode. Le résultat dépend probablement de l'orientation du substrat dans le site de la toluène dioxygénase et de l'effet stérique du substituant en *ortho* du fluor. Dans le cas du 3-fluorobenzoate, le carboxyle est encombrant et le taux de défluoration initiale tombe à 0%.

3-fluorotoluène — toluène di-oxygénase 100% — 3-mèthylcaèchol

Cette dualité, défluoration immédiate ou différée, existe aussi pour le 2-fluorobenzoate, mais la solution préférée à 75-95% chez *Pseudomonas* B13 est celle-ci :

2-fluorobenzoate — CO_2 — HF — 3-oxoadipate

La 2-halobenzoate dioxygénase aperçue dans le cas du chlore, rend aisé le métabolisme du substrat car l'halogène est enlevé dès le départ. Dans le cas contraire un *cis,cis*-2-fluoromuconate réfractaire à l'action de la cyclo-isomérase peut se former et devenir un point de blocage. En conclusion, le métabolisme des fluorobenzoates se révèle alternativement très facile ou très difficile en fonction des souches, des propriétés enzymatiques et des principes utilisés. Les considérations théoriques ne permettent pas de toujours de prévoir le caractère biodégradable de ces composés, et comme presque toujours c'est l'expérience et les tâtonnements qui apportent le dernier mot.

CONCLUSION

Avant la seconde moitié du vingtième siècle, le cycle du benzène et de ses dérivés paraissait solide comme le roc, parce que son oxydation nécessitait au laboratoire des actions énergiques. La nature effectue cette opération en douceur en s'aidant des oxygénases. La variété de ces enzymes et leurs performances étendues laissent espérer qu'elles peuvent commencer la biodégradation à l'air de presque n'importe quelle substance aromatique, et amorcer des voies métaboliques qui seront examinées dans les deux chapitres suivants.

Références

[1] Wieland T, Griss G & Haccius B (1958) *Arch. Microbiol.* **28** : 383-393 ;
Ayengar PK, Hayashi O, Nakajima M & Tomida I (1959) *Biochim. Biophys. Acta.* **33** : 111.

[2] Gibson DT, Koch JR & Kallio RE (1968) *Biochemistry* **7** : 2653-2662.

[3] Gibson DT, Hensley M, Yoshioka H & Mabry TJ (1970) *Biochemistry* **9** : 1626-1630 ;
Högn T & Jaenicke L (1972) *Eur. J. Biochem.* **30** : 369-375.

[4] Axcell BC & Geary PJ (1975) *Biochem. J.* **146** : 173-183 ;
Crutcher SE, Geary PJ (1979) *Biochem. J.* **177** : 393-400 ;
Geary PJ & Dickson PE (1981) *Biochem. J.* **195** : 199-203 ;
Geary PJ, Saboowalla F, Patil D & Cammack R (1984) *Biochem. J.* **217** : 667-673 ;
Geary PJ, Mason JR & Joannou CL (1990) *Methods Enzymol.* **188** : 52-60.

[5] Butler CS & Mason JR (1997) *Adv. Microb. Physiol.* 38 : 47-84.

[6] Yeh WK, Gibson DT & Liu TN (1977) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **78** : 401-410 ;
Jiang H, Parales RE, Lynch NA & Gibson DT (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 3133-3139.

[7] Johnson GR & Olsen RH (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 3336-3346 et (1997) **63** : 4047-4052.

[8] Olsen RH, Kukor JJ & Kaphammer B (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 3749-3756.

[9] Whited GM & Gibson DT. (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 3010-3016 ;
Pikus JD, Studts JM, Achim C, Kauffmann KE, Munck E, Steffan RJ, McClay K & Fox BG (1996) *Biochemistry* **35** : 9106-9119.

[10] Hopper DJ, Jones MR & Causer MJ (1985) *FEBS Lett.* **182** : 485-488 ;
Mathews FS, Chen ZW, Bellamy HD & McIntire WS (1991) *Biochemistry* **30** : 238-247 ;
Cunane LM, Chen ZW, Shamala N, Mathews FS, Cronin CN & McIntire WS (2000) *J. Mol. Biol.* **295** : 357-374.

[11] Spooner RA, Lindsay K & Franklin FCH. (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132** : 1347-1358 ;
Shaw JP & Harayama S (1991) *Eur. J. Biochem.* **209** : 51-61 ;
Mathews FS, Chen ZW, Bellamy HD & McIntire WS (1991) *Biochemistry* **30** : 238-247.

[12] McIntire W, Hopper DJ & Singer TP (1985) *Biochem. J.* **228** : 325-335.

[13] Lee K & Gibson DT (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 3101-3106.

[14] Velasco A, Alonso S, Garcia JL, Perera J & Diaz E (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 1063-1071 ;
Panke S, Wubbolts MG, Schmid A & Witholt B (2000) *Biotechnol. Bioeng.* **6**9 : 91-100.

[15] Cox HHJ, Faber BW, Van Heiningen WNM, Radhoe H, Doddema HJ & Harder W (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 1471-1474.

[16] Warhurst AM, Clarke KF, Hill RA, Holt RA & Fewson CA (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 1137-1145.

[17] O'Connor KE, Dobson ADW & Hartmans S (1997) *Applied Environ. Microbiol.* **63** : 4287-4291.

[18] Ensley BD, Ratzkin BJ, Ossulund TD, Simon MJ, Wackett LP & Gibson DT (1983) *Science* **222** : 167-169.

[19] Leahy JG, Byrne AM & Olsen RH (1996) *Applied Environ.Microbiol.* **62** : 825-833.

[20] Heald SC & Jenkins RO (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **45** : 56-62.

[21] Lange CC & Wackett LP (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 3858-3865.

[22] ZYLSTRA GJ & GIBSON DT (1989) *J. Biol. Chem.* **264** : 14940-14946.

[23] JIANG H, PARALES RE, LYNCH NA & GIBSON DT (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 3133-3139.

[24] RESNICK SM & GIBSON DT (1993) *J. Biodeg.* 4 : 195-203.

[25] LEE K, BRAND JM & GIBSON DT(1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **212** : 9-15.

[26] SPAIN JC, ZYLSTRA GJ, BLAKE CK & GIBSON DT (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 2648-2652.

[27] WACKETT LP & GIBSON DT (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1703-1708.

[28] PIKUS JD, STUDTS JM, MCCLAY K, STEFFAN RJ & FOX BG (1997) *Biochemistry* **36** : 9283-9289.

[29] BYRNE AM, KUKOR JJ & OLSEN RH (1995) *Gene* **154** : 65-70.

[30] JOHNSON GR & OLSEN RH (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 3336-3346.

[31] ZHOU NY, JENKINS A, CHAN KWO CHION CK & LEAK DJ (1998) *FEBS Lett.*430 : **181**-185.

[32] ENSLEY BD, RATZKIN BJ, OSSLUND TD & SIMON MJ (1983) *Science* **222** : 167-169.

[33] KAUPPI B, LEE K, CARREDANO E, PARALES RE, GIBSON DT, EKLUND H & RAMASWAMY S (1998) *Structure* **6** : 571-586.

[34] JEFFREY AM, YEH HJ, JERINA DM, PATEL TR, DAVEY JF & GIBSON DT (1975) *Biochemistry* **14** : 575-584 ;
GIBSON DT, RESNICK SM, LEE K, BRAND JM, TOROK DS, WACKETT LP, SCHOCKEN MJ & HAIGLER BE (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 2615-2621 ;
RESNICK SM, LEE K, GIBSON DT (1996) *J. Ind. Microbiol.* **17** : 438-457 ;
JERINA DM, SELANDER H, YAGI H, WELLS MC, DAVEY JF, MAHADEVAN V & GIBSON DT (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98** : 5988-5996.

[35] TOROK DS, S M RESNICK, J M BRAND & D L CRUDEN & D T GIBSON (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 5799-5805.

[36] RESNICK SM & GIBSON DT (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 4073-4080 ;
KLECKA GM & GIBSON DT (1979) *Biochem. J.* **180** : 639-645.

[37] LEE K & GIBSON DT (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 3101-3106 ;
SELIFONOV SA, GRIFOLL M, EATON RW & CHAPMAN PJ (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 507-514.

[38] RESNICK SM & GIBSON DT (1993) *Biodegradation* **4** : 195-203.

[39] LEE K, BRAND JM & GIBSON DT (1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **212** : 9-15 ;
RESNICK SM & GIBSON DT (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 4073-4080.

[40] PARALES RE, PARALES JV & GIBSON DT (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 1831-1837 ;
PARALES RE, LEE K, RESNICK SM, JIANG H, LESSNER DJ & GIBSON DT (2000) *J. Bacteriol. :* **182** : 1641-1649.

[41] CERNIGLIA CE & GIBSON DT (1977) *Appl. Environ. Microbiol.* **34** : 363-370.

[42] CERNIGLIA CE, GIBSON DT & VAN BAALEN C(1980) *J. Gen. Microbiol.* **116** : 495-500 ;
CERNIGLIA CE, FREEMAN & EVANS FE(1984) *Arch. Microbiol.* **138** : 283-286.

[43] BERMAN MH & FRAZER AC (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 925-931.

[44] GURUJEYALAKSHMI G & MAHADEVAN A.(1987) *Current Microbiol.* **16** : 69-73.

[45] YEN K-W & SERDAR CM.(1988) *CRC Critical Rev. Microbiol.* **15** : 247-268.

[46] HOPPER DJ & TAYLOR DG.(1975) *J. Bacteriol.* **122** : 1-6 ;
POH CL & BAYLY RC(1980) *J. Bacteriol.***143** : 59-69 ;
GRUND E, DENECKE B & EICHENLAUB R(1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 1874-1877.

[47] Kiyohara H, Nagao K & Nomi R (1976) *Agric. Biol. Chem.* **40** : 1075-1082.

[48] Cartwright NJ & Cain RB (1959) *J. Biochem.* **71** : 248-261 ;
Spain JC & DT Gibson (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 812-819 ;
Spain JC (1995) *Annu. Rev. Microbiol.* **49** : 523-555 ;
Jain RK, J H Dreisbach & J C Spain (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 3030-3032.

[49] Robertson JB, Spain JC, Haddock & Gibson DT (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 2643-2648.

[50] Delgado A, Wubbolts MG, Abril MA & Ramos JL (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 415-417.

[51] Zeyer J, Kocher HP, Timmis KN (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **52** : 334-339 ;
Zeyer J & Kocher HP(1988) *J. Bacteriol.* **170** : 1789-1794.

[52] Spain JC & Gibson DT (1991) *Appl. Env. Microbiol.* **57** : 812-819 ;
Jain RK, Dreisbach JH & J C Spain (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 3030-3032.

[53] Kadiyala V & Spain JC (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 2479-2484.

[54] Jain RK, Dreisbach JH & Spain JC (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 3030-3032.

[55] An D, Gibson DT & Spain JC (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 7462-7467.

[56] Suen WC & Spain JC (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 1831-1837.

[57] Vanderberg LA, Perry JJ & Unkefer PJ (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43** : 937-945 ;
Alvarez MA, Kitts CL, Botsford JL & Unkefer PJ (1995) *Can. J. Microbiol.* 41 : 984-991 ;
Martin JL, Comfort SD, Shea PJ, Kokjohn TA & Drijber RA (1997)
Can. J. Microbiol. **43** : 447-455 ;
Kalafut T, Wales ME, Rastogi VK, Naumova RP, Zaripova SK & Wild JR (1998)
Curr. Microbiol. **36** : 45-54.

[58] Watanabe M, Nishino T, Takio K, Nohmi T (1998) *J. Biol. Chem.* **273** : 23922-23928.

[59 Fujii T, Takeo M, Maeda Y (1997) *Microbiology* **143**(Pt 1) : 93-99 ;
Fukumori F & Saint CP (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 399-408 ; Saint CP, McClure NC,
& Venables WA (1990) *J. Gen. Microbiol.* **136** : 615-625.

[60] Liu Z, Yang h, Huang Z, Zhou P & Liu SJ (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58** : 679-682.

[61] Boon N, Goris J, de Vos P, Verstraete W & Top EM (2001)
Appl. Environ. Microbiol. **67** : 1107-1115.

[62] Donon B, Razo-Flores E, Luijten M, Swarts H, Lettinga G & Field G (1997)
Arch. Microbiol. Biotechnol. **47** : 83-90.

[63] Zissi U & Lyberatos G (2001) *Biotechnol. Bioeng.* **72** : 49-54.

[64] Lenke H & Knackmuss HJ (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 784-790.

[65] Bruhn C, Bayly RC & Knackmuss HJ (1988) *Arch. Microbiol.* **150** : 171-177.

[66] Schenzle A, Lenke H, Spain JC & Knackmuss JC (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 2317-2323.

[67] Van Aken B, Hofrichter M, Scheibner K, Hatakka AI, Naveau H & Agathos SN (1999)
Biodegradation **10** : 83-91.

[68] Werlen C, Kohler Y-PE & Van der Meer JR (1995) *J. Biol. Chem.* **271** : 4009-4016.

[69] Beil S, Timmis KN & Pieper DH (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 341-346.

[70] Beil S, Happe K, Timmis N & Pieper DH (1997) *Eur. J. Biochem.* **247** : 190-199.

[71] Joo H, Arisawa A, Lin Z & Arnold FH (1999) *Chem.Biol.* **6** : 699-706.

[72] Beil S, Mason JR, Timmis KN & Pieper DH (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 5520-5528.

[73] ASTURIAS JA, DIAZ E & TIMMIS KN (1995) *Gene* **156** : 11-18.

[74] JOHNSON BF & STANIER RY (1971) *J. Bacteriol.* **107** : 476-485 ;
HARDISSON C, SALA-TREPAT JM & STANIER RY (1969) *J. Gen. Microbiol.* **59** : 1-11.

[75] CORRELL CC, BATIE CJ, BALLOU DP & LUDWIG ML (1992) *Science* **258** : 1604-1610.

[76] COULTER ED, MOON N, BATIE CJ, DUNHAM WR & BALLOU DP (1999) *Biochemistry* **38** : 11062-11072.

[77] HUSAIN M & MASSEY V (1979) *J. Biol. Chem.* **254** : 6657-6666 ;
WIERENGA RK, DRENTH J & SCHULTZ GE (1983) *J. Mol. Biol.* **167** : 725-740 ;
LAH MS, PALFEY BA, SCHREUDER HA & LUDWIG ML (1994) *Biochemistry* **33** : 1555-1564.

[78] EPPINK MH, BOEREN SA, VERVOORT J & VAN BERKEL WJ (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 6680-6687.

[79] EPPINK MH, OVERKAMP KM, SCHREUDER HA & VAN BERKEL WJ (1999) *J. Mol. Biol.* **292** : 87-96.

[80] FETZNER S, MÜLLER R & LINGENS F (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 279-290 ;
ROMANOV V & HAUSINGER RP (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 3368-3374.

[81] OLTMANNS RH, MULLER R, OTTO MK & LINGENS F (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 2499-2501.

[82] RENGANATHAN V & JOHNSTON JB (1989) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31** : 419-424 ;
RENGANATHAN V (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 330-334.

CHAPITRE 9

OUVERTURE INTRADIOL DU CYCLE AROMATIQUE

L'ouverture du cycle aromatique se fait de préférence après une double hydroxylation conduisant au catéchol ou à d'autres dérivés comme le protocatéchuate, le gentisate, l'homogentisate ou l'hydroquinone. Elle est facilement réalisée si le noyau porte au moins deux hydroxyles, parfois trois dans le cas du 1,2,4-trihydroxybenzène. Les voies décrites dans ce chapitre sont parmi les plus importantes du recyclage de la matière organique dans la biosphère. Grâce à elles, des substances qu'on aurait pu supposer indigestes pour les êtres vivants sont rapidement transformées en composés simples directement assimilables par le métabolisme intermédiaire des cellules, selon des voies dont on apercevra les détails. Ce chapitre permettra de faire connaissance avec différents systèmes enzymatiques essentiels, dioxygénases, isomérases, hydrolases, ainsi qu'avec les problèmes posés par les dérivés halogénés qui sont produits en nombre par l'activité industrielle.

9 – OUVERTURE INTRADIOL DU CYCLE AROMATIQUE

L'ouverture du cycle aromatique non halogéné se fait de préférence après une double hydroxylation conduisant au catéchol ou à d'autres dérivés tels que le proto-catéchuate, le gentisate, l'homogentisate ou l'hydroquinone. Elle est facilement réalisée si le noyau porte au moins deux hydroxyles, parfois trois dans le cas du 1,2,4-trihydroxybenzène **[1]**. Les voies décrites dans ce chapitre sont parmi les plus importantes du recyclage de la matière organique dans la biosphère. Grâce à elles, des substances qu'on aurait pu supposer indigestes pour les êtres vivants sont rapidement transformées en composés simples directement assimilables par le métabolisme intermédiaire des cellules.

9.1 - RUPTURE AÉROBIE DU CYCLE

Nous savons que la dégradation aérobie d'un composé aromatique s'effectue typiquement en deux temps. La première phase fragilise le cycle par oxygénation selon les modalités décrites dans le chapitre précédent. La seconde phase consacre l'ouverture du cycle et les transformations successives qui conduisent au métabolisme cellulaire central (cycle de KREBS). Lorsque le substrat de départ contient plusieurs cycles aromatiques, une règle assez générale veut que l'un d'eux soit dégradé entièrement avant que le reste de la molécule soit entamé.

La rupture du cycle aromatique survient après une dioxygénation, lorsque la molécule comporte deux hydroxyles situés en *ortho* (catéchol) ou en *para* (gentisate) l'un par rapport à l'autre. L'introduction des atomes d'oxygène sur le cycle se fait sans faire appel à une source d'électrons extérieure. Les enzymes utilisées sont donc totalement distinctes des dioxygénases décrites dans le chapitre précédent et appartenant à la famille des arène dioxygénases. La scission *ortho* du cycle s'effectue entre deux hydroxyles adjacents, contrairement au cas *méta*. Les deux modes sont réalisés par des dioxygénases différentes. Une dioxygénase *ortho* est désignée dans la littérature comme dioxygénase "intradiol", tandis qu'une enzyme *méta* est "extradiol". La rupture du gentisate est un cas particulier. Les trois substrats emblématiques, **catchol, protocatéchuate** et **gentisate**, ont été créés par hydroxylation du noyau aromatique et sont de fréquents intermédiaires des voies de biodégradation : Ces différentes voies opèrent en présence d'oxygène moléculaire chez les procaryotes et les eucaryotes.

catéchol protocatéchuate gentisate

ortho *méta* *ortho* *méta*

Elles offrent des variantes selon les substrats et les espèces, et canalisent les transformations de presque toutes les molécules aromatiques biodégradables, naturelles ou artificielles, en libérant des produits ordinaires du métabolisme central. Par exemple la voie *ortho* du catéchol conduit au 3-oxoadipate (ou β-cétoadipate), $^{-}OOC{-}CH_2{-}CO{-}(CH_2)_2{-}COO^{-}$, qui sera scindé en succinate et acétyl-coenzyme A. Ce métabolisme est souvent désigné comme la voie du 3-oxoadipate. Chez les bactéries, les gènes concernés sont généralement localisés sur le chromosome, mais peuvent être situés sur un plasmide. Les gènes *méta* sont communément logés sur des "plasmides de dégradation" et codent pour des enzymes aux spécificités élargies et diversifiées. On les trouve impliquées dans la dégradation complète d'aromatiques variés comme le phénol, le toluène et le naphtalène.

Les modes d'ouverture *ortho* et *méta* du noyau aromatique sont connus depuis les années cinquante. Parmi les pionniers furent DAGLEY, EVANS, HAYASHI, ORNSTON, STANIER et beaucoup d'autres. Ces premiers travaux ont montré que les potentialités naturelles d'élimination des composés organiques comme les aromatiques étaient plus vastes qu'escomptées, à une époque où les préoccupations sur la protection de l'environnement commençaient à faire surface dans le panorama politique.

9.2 - VOIES ORTHO

L'ouverture intradiol du catéchol et de ses dérivés est très répandue chez les micro-organismes associés aux racines des plantes. Cela s'explique facilement par les nombreux échanges au sein de la rhizosphère et l'émission de composés phénoliques variés par la plante. En outre la dégradation de la lignine libère des aromatiques à faible masse moléculaire qui sont déméthylés et transformés en protocatéchuate. La présence d'une protocatéchuate 3,4-dioxygénase dans un germe signale qu'il possède une voie *ortho* fonctionnelle, dite voie du 3-oxoadipate. Une catéchol 1,2-dioxygénase offre un indice similaire. Elle est particulièrement active dans les espèces utilisatrices du benzoate. Celui-ci est métabolisé par la voie *ortho*

avec le catéchol comme intermédiaire. Les souches bactériennes capables de se multiplier sur benzoate comme seule source de carbone et d'énergie sont légion dans le sol, en particulier parmi les actinomycètes appartenant aux genres *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Streptomyces* **[2]**. Dans la plupart des cas, les dioxygénases concernées sont inductibles et soumises à une répression catabolique. Elles n'apparaissent donc pas si le milieu contient une source glucidique comme le glucose.

Le schéma de base de la voie *ortho* ou voie du 3-oxoadipate est à peu près toujours le même, malgré de petites différences entre bactéries et eucaryotes **[3]**. Le tableau de la page suivante résume l'ensemble. Les différentes réactions sont signalées par un numéro. Ainsi les étapes **1** et **2** sont catalysées respectivement par la protocatéchuate 3,4-dioxygénase et la catéchol 1,2-dioxygénase. Le muconate formé après l'ouverture du cycle possède une configuration déterminée au niveau des deux liaisons doubles, et correspond au *cis*,*cis*-muconate [1]. On doit en grande partie au travail remarquable d'Ornston la première identification des différentes étapes **[4]** ! Les codes EC et les noms des différentes protéines ont été ajoutés dans un tableau pour faciliter les recherches par mot clé.

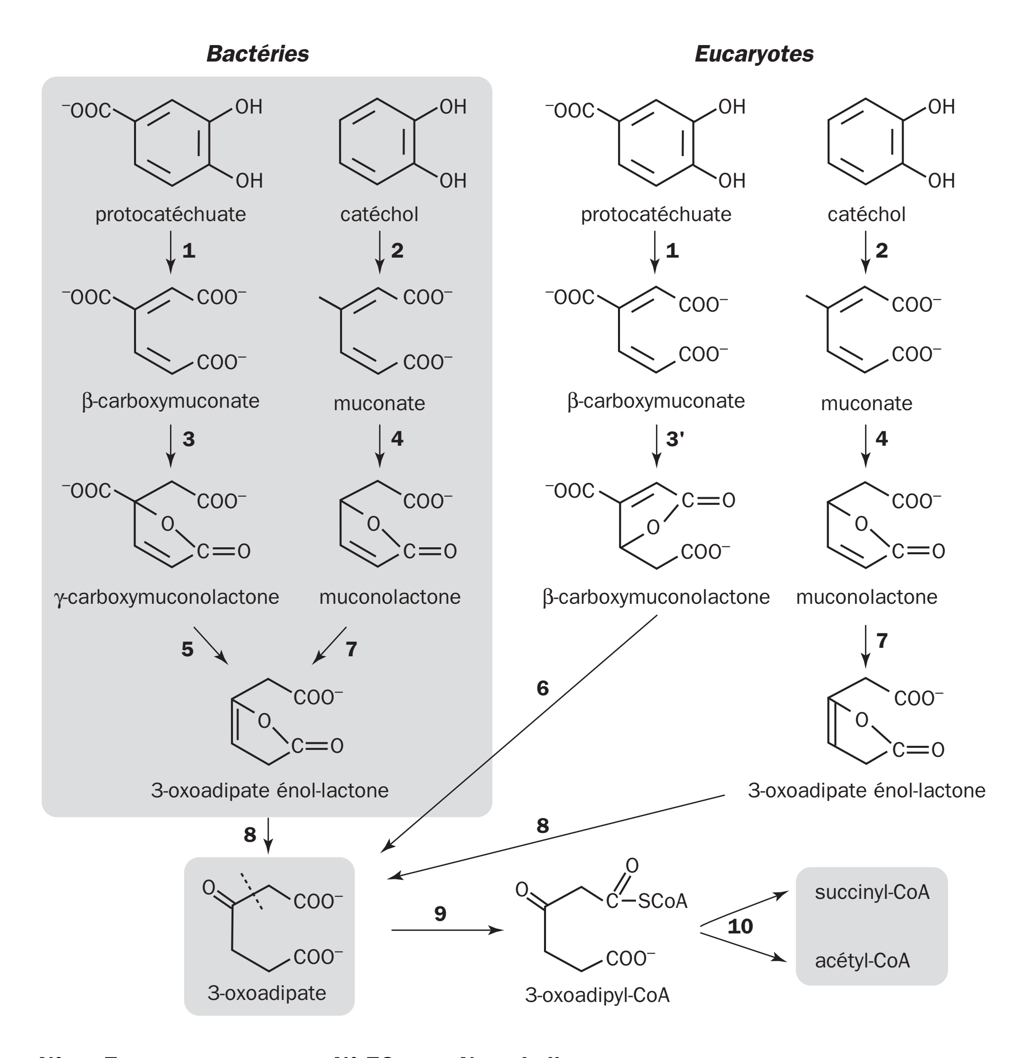
Résumons quelques observations générales. Une première constatation très importante est la convergence des deux branches du protocatéchuate et du catéchol. Elle se fait en amont de l'oxoadipate chez les bactéries, ou à son niveau chez les eucaryotes. Des enzymes séparées catalysent ces deux voies dès leur départ : il y a deux dioxygénases distinctes (**1** et **2**), des cyclo-isomérases différentes (**3** et **4**) agissant sur les diacides formés, et ainsi de suite. Le tableau se complique un peu quand on passe d'une espèce à l'autre. Un même jeu d'enzymes devrait participer à la fois au métabolisme du protocatéchuate comme à celui du catéchol au-delà du point de convergence (réactions **8**, **9** et **10**). C'est ce qu'on observe chez les *Pseudomonas*, mais pas chez les *Acinetobacter*. Ces derniers ont deux séries d'enzymes distinctes mais de même spécificité, d'un côté PcaD, PcaIJ, PcaF, et de l'autre CatD, CatI, CatF. Les enzymes faites en double sont dites iso-fonctionnelles ou encore iso-enzymes. Pourquoi ce luxe ? Les impératifs des régulations en sont peut-être responsables, chaque série de gènes affectés à la dégradation du substrat initial étant exprimée ou réprimée en bloc selon les conditions du milieu.

Deuxième observation : les 9 enzymes qui transforment le catéchol et le protocatéchuate en succinate et acétyl-CoA sont l'outillage de base du métabolisme *ortho*. Elles ont été purifiées pour la première fois chez *Pseudomonas putida*. Ce métabolisme est fort commun chez les organismes Gram-positifs ou négatifs. Plus d'une douzaine d'espèces bactériennes ont fait l'objet d'études détaillées, ainsi que des levures, des champignons ascomycètes et basidiomycètes [2].

---

1 - Pour la commodité, la notation cis/trans utilisée dans la littérature biochimique est conservée ici, plutôt que la notation chimique Z/E qui serait en principe la plus correcte.

2 - Pour les Gram-positifs : Bacillus, Arthrobacter, Rhodococcus, Nocardia. Pour les négatifs : Acinetobacter, Agrobacterium, Azotobacter, Burkholderia, Comamonas, Enterobacter, Pseudomonas, Ralstonia (Alcaligenes), Rhizobium. Chez les eucaryotes : Aspergillus, Rhodotorula, Trichosporon cutaneum, Neurospora crassa.



N°	Enzyme	N° EC	Nom de l'enzyme
1	PcaGH (PcaA)	1.13.11.3	protocatéchuate 3,4-dioxygénase
2	CatA	1.13.11.1	catéchol 1,2-dioxygénase
3	PcaB	5.5.1.2	β-carboxy-muconate cyclo-isomérase (lactonisante)
3'		5.5.1.5	β-carboxy-muconate cyclo-isomérase (eucaryotes)
4	CatB	5.5.1.1	muconate cyclo-isomérase (lactonisante)
5	PcaC	4.1.1.44	γ-carboxymuconolactone décarboxylase
6		3.1.1.-	β-carboxymuconolactone hydrolase (eucaryotes)
7	CatC	5.3.3.4	muconolactone isomérase
8	PcaD, CatD	3.1.1.24	3-oxoadipate énol-lactone hydrolase
9	PcaIJ, CatIJ	2.8.3.6	3-oxoadipate : succinyl-CoA transférase
10	PcaF, CatF	2.3.1.-	3-oxoadipyl-CoA thiolase

Malgré cette distribution visiblement étendue, les germes compétents sont la plupart du temps des habitants du sol et des rhizosphères [3].

Une autre observation importante est d'ordre génétique. Les gènes des voies *ortho* sont généralement regroupés en opérons sur le chromosome, et soumis à induction et répression. En somme les cellules ne fabriquent les enzymes correspondantes que si elles en ont besoin. Il existe cependant de grandes divergences d'une espèce à l'autre en ce qui concerne la disposition des gènes et leur régulation. Citons l'exemple de *Acinetobacter calcoaceticus* **[5]**.

racémase
R-mandélate
shikimate
quinate
QuiA
QuiA
CO_2
QuiC
QuiB
QuiC
CO_2
BenABC
BenD
PobA
benzoate
catéchol
protocatéchuate
4-hydroxybenzoate
CatA **PcaGH**
(vers 3-oxoadipate)

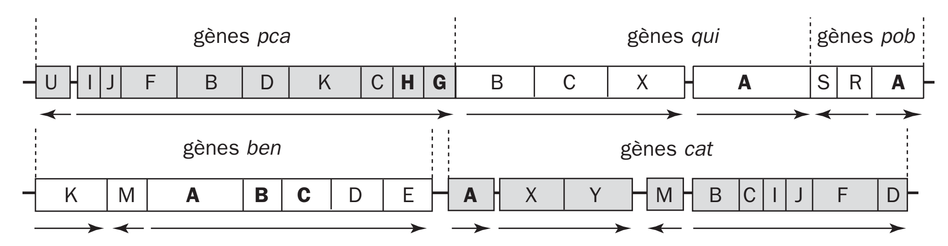
Cette espèce utilise ses voies *ortho* pour transformer divers composés cycliques dont quelques-uns ont été représentés ci-dessus. On y trouve le mandélate qui aboutit au benzoate et au catéchol. Le shikimate et le quinate [4] sont transformés

3 - *La découverte des voies de dégradation des aromatiques a mis sur la sellette des genres tels que les Bacillus, Pseudomonas et autres formes isolées du sol, détrônant la suprématie des colibacilles au laboratoire. La microbiologie de l'environnement est alors apparue plus que jamais dans son immense diversité et ses nombreuses surprises.*

4 - *L'acide quinique (pour simplifier, la stéréoisomérie exacte n'a pas été précisée sur la formule) est un produit naturel abondant dans l'écorce de quinquina, les feuilles de tabac et de carottes, et les fruits tels que les*

en protocatéchuate, qui est atteint aussi à partir du 4-hydroxybenzoate. Des symboles conventionnels désignent les enzymes. Dans le signe BenABC de la benzoate dioxygénase, les lettres A, B et C désignent les trois gènes distincts codant pour le complexe de trois composants correspondant à cette enzyme **[6]**. Quant à la 4-hydroxybenzoate hydroxylase, que nous connaissons aussi, son unique chaîne polypeptidique est désignée par PobA.

Le schéma suivant montre les différents gènes d'*Acinetobacter calcoaceticus* regroupés en deux ensembles. Le premier dirige l'apparition du protocatéchuate (gènes *qui*, *pob*), et son métabolisme (gènes *pca*). La protéine QuiA est une déshydrogénase membranaire à *PQQ** active à la fois sur le kinate et le shikimate. La protocatéchuate 3,4-dioxygénase correspond à PcaHG. Elle est constituée de deux chaînes de séquences homologues. Le second ensemble s'adresse au catéchol (*ben*, *cat*). La catéchol 1,2-dioxygénase (CatA) n'a qu'une seule sorte de chaîne.



Organisation des gènes chez Acinetobacter calcoaceticus

Cet *Acinetobacter* a été choisi parce qu'il est doté d'une collection assez complète de gènes qui sont regroupés grosso modo par fonction. Une telle organisation facilite certainement le contrôle rigoureux de leur transcription par blocs séparés en fonction des conditions physiologiques. Il n'y a pas que des enzymes dans les produits d'expression. Les protéines CatB, CatM, PobR, PobS et BenM sont régulatrices. Le facteur QuiX est considéré comme une porine, tandis que PcaK et BenK seraient des transporteurs. Les flèches désignent les portions génomiques qui sont transcrites d'un seul tenant par un même ARN messager. Chose curieuse, l'ordre des gènes, leur nombre et leur disposition varient considérablement d'une espèce à l'autre. Sans doute chaque germe gère-t-il la marche de son métabolisme à sa façon. Malgré la diversité constatée dans la disposition des gènes, le séquençage d'ADN met en relief des homologies très nettes suggérant une origine ancestrale commune pour plusieurs segments des voies *ortho*.

Comment l'expression des différents gènes est-elle régulée ? À la diversité des cartes génomiques correspond une variété de modes. L'inducteur est soit le substrat initial, soit un intermédiaire. Chez *Acinetobacter*, le protocatéchuate et le catéchol sont traités par des séries d'enzymes indépendantes malgré la convergence des deux voies en aval. Des enzymes sont en double comme nous l'avons remarqué, PcaIJ et Cat IJ (**9** du tableau antérieur), PcaF et CatF (**10** du tableau) **[7]**. Au contraire, une seule enzyme au lieu de deux catalyse chacune de ces réactions

poires avant maturité. L'acide shikimique est un intermédiaire important de la synthèse du noyau aromatique (végétaux, bactéries).

chez *Pseudomonas putida*. Lorsque les enzymes sont en double comme dans *Acinetobacter*, chacune est induite avec la série à laquelle elle appartient. Le protocatéchuate induit les protéines PcaIJ et PcaF ainsi que toutes les protéines Pca, mais reste sans action sur la série Cat **[8]**. Pour agir ainsi, le protocatéchuate est reconnu par PcaU, qui fonctionne comme activateur de transcription. Dans la série du catéchol les choses sont différentes. L'inducteur est le *cis*,*cis*-muconate, le produit intermédiaire fait à partir du catéchol par la dioxygénase CatA. Il est reconnu par CatB. En outre CatA est aussi induite par le benzoate, ce qui est logique puisque *Acinetobacter* convertit le benzoate en catéchol. En induisant la synthèse de la catéchol dioxygénase, le benzoate favorise l'apparition du muconate, qui induit à son tour le reste des enzymes de la voie. Ces différentes inductions sont donc déclenchées en cascade.

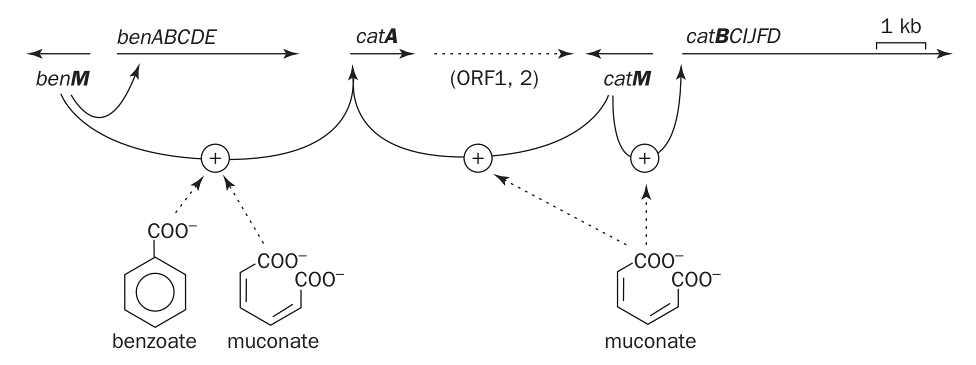
L'examen expérimental de ces régulations offre un spectacle intéressant. L'induction de la voie *ortho* par le substrat de départ semble assez logique. Ainsi le protocatéchuate déclenche sa propre dégradation. Le substrat étant présent, le robinet s'ouvre pour sa transformation. Le substrat ayant disparu, il y a fermeture du dispositif. L'inducteur général est assez souvent un produit intermédiaire, comme ici le muconate (ou son analogue carboxylé dans la branche du protocatéchuate). Situé plus loin en aval, le 3-oxoadipate induit une grande partie de la branche du protocatéchuate chez diverses espèces étudiées (*Pseudomonas putida*, *Azotobacter* et *Nocardia*). La branche du catéchol est également induite par le 3-oxoadipate dans *Nocardia*. On pourrait y voir un cercle vicieux. Si le 3-oxoadipate inducteur déclenche sa propre formation en stimulant la synthèse de la dioxygénase, il faut qu'il en existe un taux suffisant pour amorcer la pompe. Encore faut-il que la voie en amont soit elle-même induite, faute de quoi il n'y aurait pas assez d'inducteur pour lancer la machine. Comment sortir de cette situation de blocage ?

Dans la réalité, les régulations bactériennes ne sont presque jamais des commandes de tout ou rien, et les protéines sont tout de même produites à taux réduit en absence d'induction. L'oxygénation du catéchol a lieu au ralenti en conditions non induites et fait un peu de muconate. En somme la nature s'arrange pour maintenir une petite fuite de produit même quand le robinet est fermé. Si pour une raison quelconque le métabolisme du catéchol s'accélère, il en résulte une bouffée supplémentaire de muconate et d'oxoadipate qui vont atteindre un niveau suffisant pour accélérer la production des différentes enzymes de la voie. Il en résulte une accélération brusque et importante du métabolisme. Le même mécanisme fonctionne pour le protocatéchuate. Il s'agit donc d'un phénomène d'amplification dans une zone étroite de conditions. Un petit changement des facteurs du milieu suffit à déclencher une forte réponse dans un sens ou dans l'autre. D'autre part certains métabolites apparus au cours de cette biodégradation sont toxiques pour la cellule. Au-dessus de la neutralité, le catéchol et ses dérivés substitués sur le noyau s'oxydent facilement à l'air et engendrent des radicaux. Le catéchol à concentration faible (moins de 10 ppm) est un inhibiteur de croissance pour de nombreux germes et séquestre facilement les métaux comme le fer [5].

---

5 - *Ainsi le protocatéchuate donne avec le fer une coloration violette. Dans les cultures faites sur protocatéchuate, la disparition de la coloration permet de se rendre compte de la consommation du substrat.*

Dans le même ordre d'idée, un *Acinetobacter* est un bon exemple de l'articulation de ces réglages **[9]**. Ce germe se développe sur benzoate comme seule source de carbone et d'énergie. Le benzoate est reconnu par le produit du gène *benM*, qui induit l'opéron *benABCD* dirigeant le passage du benzoate au catéchol. Un schéma explique le dispositif.



Gènes du benzoate et du catéchol

Les gènes *ben* et *cat* déterminent la transformation complète du benzoate par l'intermédiaire du catéchol, du *cis,cis*-muconate et de la voie *ortho*. Ils sont échelonnés sur un segment d'ADN de 20 kb environ. Les gènes *benM* et *catM* en sont des gènes régulateurs. Leur transcription en sens contraire de celui des opérons est tout à fait caractéristique. Le produit de *benM*, (BenM), reconnaît le benzoate ou le muconate et active la transformation du benzoate en catéchol. De même la protéine régulatrice CatM reconnaît le *cis,cis*-muconate, active à la fois la production de CatA (la catéchol dioxygénase) et la sortie de toutes les enzymes de la voie *ortho*.

La catéchol 1,2-dioxygénase (CatA) occupe une position intéressante car c'est elle qui engendre le muconate, et son induction séparée par deux actions indépendantes semble avantageuse. La première enzyme de la voie *ortho* est CatB, c'est-à-dire la muconate cyclo-isomérase.

Les mutants à régulateur BenM altéré ne peuvent plus croître sur benzoate, car les enzymes correspondantes ne sont produites qu'à taux trop faible pour être compatible avec la croissance. Une deuxième mutation compense en partie ce défaut. Elle est facile à sélectionner, car les bactéries se développent à nouveau sur benzoate. Elle se situe de préférence dans *catB* qui est le gène de la muconate cyclo-isomérase. Cette enzyme n'est pas supprimée, seulement faite sous une forme un peu moins active. Les auteurs ont vérifié que le taux de muconate dans ces doubles mutants tendait à s'élever, car il était moins rapidement transformé au fur et à mesure de sa formation. Or le muconate est inducteur et son taux plus élevé devrait renforcer son action. On voit pourtant sur le schéma que le muconate n'est pas censé induire l'utilisation du benzoate. Comment expliquer ce paradoxe ?

Le mécanisme probable est celui-ci. Les deux protéines régulatrices, CatM et BenM, se ressemblent énormément par leur séquence, font partie des activateurs

de la famille de *LysR** et ont des propriétés comparables. CatM est seule en lice dans les doubles mutants et ne reconnaît pas le benzoate, mais peut remplacer partiellement BenM en présence d'un taux élevé de muconate. Le système s'auto-entretient parce que le fonctionnement de l'opéron *ben* renforce la production de muconate, qui active toute la voie. Toute augmentation du taux de muconate facilite l'utilisation du benzoate, toute chute du muconate pour une raison ou pour une autre ayant l'effet inverse. Le comportement métabolique d'une souche bactérienne dépend donc de son outillage en enzymes et en régulateurs, et chaque espèce gère le problème à sa façon.

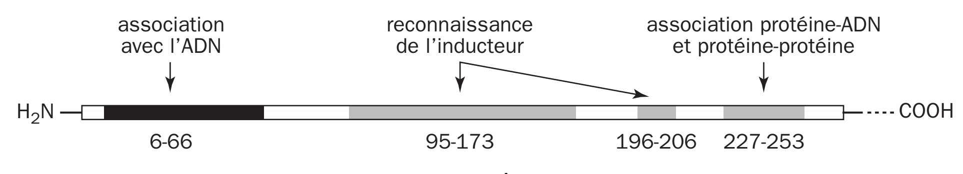
Les transporteurs font également partie des facteurs nécessaires à une biodégradation toutes les fois que les substrats doivent pénétrer dans la cellule. L'importation des substrats et inducteurs à travers la membrane cytoplasmique est souvent une étape limitante de tout le métabolisme. Le chimiotactisme vient souvent en renfort dans les espèces mobiles. *Acinetobacter* n'est pas un germe mobile, mais les protéines PcaK et BenK indiquées précédemment seraient des transporteurs du 4-hydroxybenzoate et du benzoate respectivement **[10]**.

Le transporteur PcaK a été reconnu comme important chez *Pseudomonas putida*, qui est une espèce mobile. Cette protéine ressemble à d'autres transporteurs membranaires. Exprimée dans le colibacille, elle détermine spécifiquement l'accumulation du 4-hydroxybenzoate à l'intérieur de la bactérie. La saturation intervient à taux relativement bas (70 µM). À défaut de ce transporteur, *Ps. putida* n'accumule plus le substrat et sa croissance est ralentie. En même temps la protéine PcaK ferait office de récepteur chimiotactique, permettant aux cellules de se diriger vers la source **[11]**. La même espèce est aussi capable d'accumuler le 3-oxoadipate par un transport qui est sous la dépendance de PcaT (absent chez *Acinetobacter*). Nous savons que l'oxoadipate est un inducteur de la voie *ortho*. Le transporteur PcaT favorise donc sa propre induction. Chose curieuse, l'induction de PcaT par l'oxoadipate est plus faible que celle des autres protéines Pca. Pourquoi ? Les auteurs pensent que c'est une adaptation qui permet aux bactéries de ne pas se charger intempestivement en adipate, un analogue structural du substrat normal **[12]**. L'adipate est l'anion du diacide de formule $HOOC–(CH_2)_4–COOH$. Or l'adipate est présent dans l'environnement où il est consommé par d'autres espèces, notamment par *Pseudomonas aeruginosa* **[13]**. Comme l'adipate est également pompé par PcaT, *Ps. putida* n'aurait pas intérêt à le faire entrer en excès au risque de dérégler l'induction de sa voie *ortho*.

Ces données succinctes peuvent sembler assez compliquées, mais illustrent la multiplicité des facteurs et des conditions à respecter pour qu'un organisme donné puisse se développer en utilisant une voie comme celle de l'oxoadipate. Une croissance équilibrée est le résultat d'une série de réglages et de compromis qui posent parfois un casse-tête à l'analyse expérimentale, mais constitue un asservissement perfectionné aux conditions physiologiques.

9.3 - RÉGULATEURS

Les flux métaboliques sont souvent réglés par des activateurs de transcription. L'activateur CatM d'*Acinetobacter calcoaceticus* déclenche l'expression des gènes *cat* en présence du *cis,cis*-muconate. Une protéine très étudiée est CatR [6] de *Pseudomonas putida* et appartient au même type. Sous l'effet du muconate, elle active l'expression de l'opéron *catBC* (muconate cyclo-isomérase et muconolactone isomérase, réactions 4 et 7) ainsi que *catA* (catéchol 1,2-dioxygénase). La protéine a été purifiée et il a été possible d'examiner ses relations avec l'ADN **[14]**. CatR fait partie de l'importante famille des régulateurs de type *LysR**, protéines diverses par leur fonction mais toutes bâties sur le même modèle structural qui témoigne d'une origine évolutive commune **[15]**.



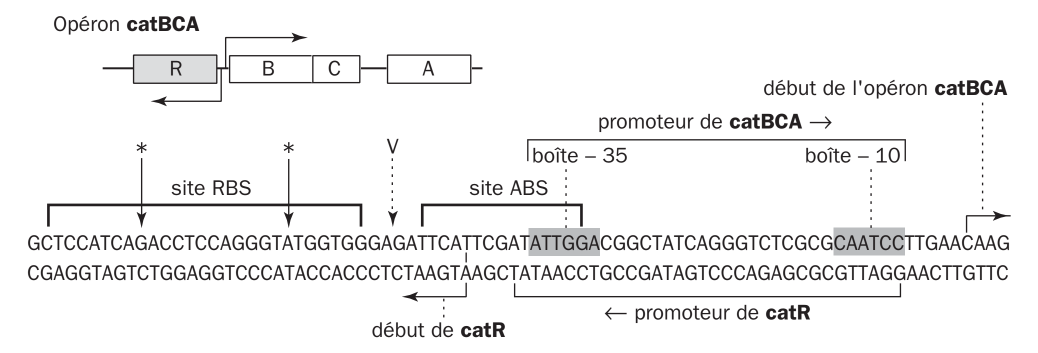
Domaines d'un régulateur LysR

Pour savoir comment fonctionne CatR sur l'ADN, on dispose d'un certain nombre de techniques éprouvées : mutagenèse, protection de l'ADN à la Dnase I, attachement à des polynucléotides synthétiques… En l'absence d'inducteur, CatR se lie sous forme d'un dimère à l'ADN en amont de l'opéron *catBC* sur une région appelée RBS (*repression binding site*). Cette portion comporte deux bases G et A séparées par 11 nucléotides, soit G-n_{11}-A, et présente une symétrie imparfaite. Ces caractères se retrouvent généralement sur les sites de liaison des régulateurs LysR (le consensus étant plus souvent T-n_{11}-A) **[16]**. En présence du muconate 100 µM comme inducteur, la protéine CatR subit un léger changement de conformation qui lui permet de s'attacher à un site supplémentaire appelé ABS (*activation binding site*) qui chevauche en partie le promoteur.

La séquence de cette région et la position de ces sites sont indiquées par un schéma, où les barres placées au-dessus notent les régions protégées de la Dnase 1 lorsqu'elles sont recouvertes par les protéines spécifiques (dans le test utilisé). La ligne de séquence du haut se lit de gauche à droite et précède les gènes *catBCA*. C'est donc le brin d'ADN dit signifiant (l'image positive de cet opéron, le brin d'en face étant son négatif). On y observe les sites *RBS*, *ABS* et le *promoteur** avec ses *boîtes** – 35 et – 10. Les lettres marquées d'une astérisque sont les positions G et A qui sont caractéristiques des régulateurs du type LysR. La ligne du dessous est le brin complémentaire (le négatif). Il se lit de droite en gauche. C'est le brin signifiant pour le gène *catR*. Celui-ci est donc transcrit de droite à gauche à partir d'un promoteur situé en amont.

---

6 - Des sigles différents ont été choisis par hasard, alors que CatM et CatR sont en quelque sorte synonymes.



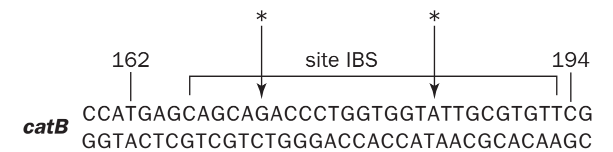
Gènes chomosomiques de Pseudomonas putida

Deux promoteurs sont superposés ainsi sur le même segment d'ADN et commandent la transcription dans des directions opposées. Cette situation a ses répercussions. Quand la protéine CatR est installée sur l'ADN, elle perturbe l'expression de son propre gène *catR* et agit donc sur lui comme un répresseur. Si la protéine vient à s'écarter, l'inhibition s'efface et la transcription peut reprendre. Ce dispositif garantit une synthèse de catR juste suffisante à sa fonction régulatrice, sinon les molécules CatR en trop risqueraient de bloquer la machine.

Le détail de l'action régulatrice de CatR est en partie connu. En l'absence du muconate inducteur, un dimère de CatR s'attache sur le site RBS, et un deuxième dimère viendrait s'entasser au-dessus du premier, le complexe ainsi formé faisant office de répresseur expliquant l'auto-limitation que CatR impose à sa propre synthèse puisque son gène situé un peu plus loin est encombré. En même temps la protéine CatR n'a qu'une affinité faible pour la zone marquée ABS, avec un chevauchement partiel du promoteur. Cela suffit à encombrer la zone d'ADN où l'ARN-polymérase doit s'installer et amorcer la transcription vers la droite de l'opéron *catBC*. Il en résulte un équilibre subtil où CatR entrave à la fois sa propre synthèse et l'expression de l'opéron *catBC*, tout en étant activatrice de cette dernière ! Le départ pur et simple de CatR, qui n'est pas fortement lié à l'ADN, n'arrangerait donc rien. On croit connaître la véritable raison pour laquelle CatR en place sur l'ADN empêche la transcription de *catBC*. Une déformation importante de l'ADN entre les deux sites RBS et ABS a été décelée, à la position – 50 du schéma marquée d'une flèche et d'un "V". Le coude formant un angle assez fermé de 35 à 40° dans l'ADN à cette position, a été repéré par sa grande sensibilité à la Dnase 1. La sensibilité de la zone de flexion à la Dnase 1 est exacerbée, et permet de la caractériser. Cette distorsion est considérée comme le principal obstacle au démarrage de la transcription en absence d'inducteur. Il est très important de se rappeler que les effets régulateurs ne sont pas seulement dûs à l'association physique entre protéines et portions spécifiquement reconnues sur l'ADN, mais aux distorsions imposées à la structure de la double hélice.

Que fait l'inducteur ? Le *cis,cis*-muconate est reconnu par CatR, qui change de conformation et tend à se détacher du site ABS sans perdre tout contact avec l'ARN-polymérase. En même temps l'angle formé dans l'ADN s'ouvre légèrement. Par des relations structurales encore mal élucidées, des contacts entre

l'ARN-polymérase et CatR faciliterait l'amorçage. Ces relations ne sont pas les seules à s'établir. Un troisième site de fixation pour CatR nommé IBS (*internal binding site*) a été identifié en aval dans le gène de CatC entre les positions 167 et 194. En présence d'inducteur, CatR se lie coopérativement sur RBS, ABS et IBS, donc à trois endroits différents.



Il y a un troisième site de fixation de CatR en aval dans le gène catB

L'intervention du site IBS reste obscure, mais elle a été mise en évidence par plusieurs techniques in vitro et par mutagenèse. Par exemple à la position 171 (astérisque), CHUGANI & coll. ont montré que le remplacement de G par A engendre une symétrie presque parfaite et un motif T-n_{11}-A très favorable à la fixation d'un régulateur de la famille LysR dont CatR fait partie. L'expérience montre alors que CatR s'associe en effet plus étroitement à IBS et exerce une certaine répression sur l'expression des gènes *catBC*. Inversement une autre mutation détruisant la symétrie a l'effet contraire (deuxième astérisque). La fonction de ce site interne est peut-être de modifier la courbure de l'ADN dans la région du promoteur. Mais le réglage exercé ici apparaît bien comme la conjonction d'influences nées à la fois de l'interaction des protéines sur l'ADN et de la déformation de celui-ci. Le principe de ces réglages est probablement répandu dans les espèces bactériennes. Des faits similaires ont été observés chez *Acinetobacter calcoaceticus* où l'équivalent de CatR s'appelle CatM et fonctionnerait aussi comme répresseur et activateur **[17]**.

En conclusion, cette section nous a montré comment une même biodégradation, concernant ici le benzoate par la voie *ortho*, ne peut se contenter de la batterie des catalyseurs nécessaires, mais doit s'appuyer sur des facteurs régulateurs capables de détecter la présence du substrat et d'intermédiaires réactionnels, sans oublier les transporteurs. Le sujet abordé ici est mieux connu chez les bactéries que chez les eucaryotes où les recherches sur les régulations des voies *ortho* sont encore peu avancées. Chez les champignons où elles ont été étudiées, il apparaît d'ores et déjà que le modèle bactérien n'y est guère directement extrapolable. Les voies de l'oxoadipate ont évolué indépendamment dans les deux grands groupes vers des solutions convergentes.

9.4 - VOIES ORTHO MODIFIÉES

Le catéchol est placé à la convergence de biodégradations concernant de nombreux composés aromatiques, mais l'usage intensif des produits chlorés comme pesticides, herbicides, solvants, et isolants crée des contraintes d'environnement nouvelles. Dans les cas les plus favorables, les substrats chlorés sont transformés comme leurs homologues non-chlorés avec la même série d'enzymes. Deux cas

sont possibles. Le premier est l'élimination du chlore avant destruction du cycle aromatique, faisant apparaître un catéchol facilement métabolisable. La transformation du 2-chlorobenzoate en catéchol en est un exemple parmi d'autres. Deuxième cas : le chlore n'est pas éliminé et se retrouve dans un chlorocatéchol. Le départ de l'halogène sera réalisé éventuellement au cours des réactions ultérieures si le cycle ne comporte pas plus de deux ou trois atomes de chlore. La même remarque s'applique aux dérivés aromatiques fluorés, bromés et iodés, mais les études portant sur les substrats chlorés ont été de loin les plus détaillées.

Les chlorocatéchols sont dégradés le plus souvent selon le schéma *ortho*. Lorsque le point de départ est du catéchol non substitué, les enzymes nécessaires sont généralement incapables de transformer efficacement les dérivés chlorés correspondants, soit parce que l'halogène crée un encombrement stérique qui entrave l'accès au site actif de l'enzyme, soit parce que l'halogène exerce un effet attracteur des électrons qui modifie la réactivité du substrat. Les transformations conduisent alors à une impasse se traduisant par le rejet de sous-produits dans le milieu. Ces composés peuvent rester inertes ou s'oxyder sous l'action de peroxydases avant de se polymériser en pigments, un phénomène constaté chez *Pseudomonas fluorescens* **[18]**. Cependant de nombreuses espèces bactériennes sont capables de métaboliser les chlorocatéchols par la voie *ortho*, et ont généralement deux séries parallèles d'enzymes, une pour le catéchol, une autre pour les dérivés chlorés. Dans la première, les enzymes sont plus ou moins spécifiques et n'ont qu'une activité réduite ou nulle sur les substrats analogues chlorés. Dans la seconde, le spectre d'action est plus large, les enzymes pouvant traiter avec une efficacité variable aussi bien les substrats non chlorés que chlorés.

Ce principe a été découvert initialement dans la souche B13 d'un *Pseudomonas* utilisant le 3-chlorobenzoate comme seule source de carbone et d'énergie **[19]**. Les transformations de départ se font selon un principe connu et le 3-chlorobenzoate engendre deux catéchols monochlorés.

3-chlorobenzoate
(dioxygénase)
(déshydrogénase)

Oxygénation initiale du 3-chlorobenzoate

En croissance sur 3-chlorobenzoate, la souche induit une chlorocatéchol 1,2-dioxygénase (ClcA) distincte de la dioxygénase standard active sur le catéchol (CatA) **[20]**. De nombreux travaux ont montré qu'une biodégradation sur ce principe était finalement fort répandue **[21]**. Le tableau compare la transformation en 3-oxoadipate du catéchol, du 3-chlorocatéchol, du 4-chlorocatéchol et du 2,4-dichlorocatéchol. Les chlorocatéchols sont traités par une voie *ortho* modifiée permettant ici le départ de un ou deux ions chlorure.

La différence la plus importante est au niveau de la cyclisation du muconate chloré ou dichloré. La cyclo-isomérase est notée ici ClcB. Elle catalyse à la fois une lactonisation et l'élimination du chlorure, ce que ne sait pas faire CatB (la cycloisomérase standard). L'autre différence essentielle porte sur la présence d'une diène hydrolase (ClcD) dont le substrat a deux liaisons C=C.

La voie de l'oxoadipate dite "modifiée" consacrée à la transformation des chlorocatéchols est codée invariablement par des plasmides, à l'exception de la maléylacétate réductase **[22]**. Les données les plus nombreuses proviennent des plasmides pJP4 (*Ralstonia*) **[23]**, pAC27 **[24]**, pP51 **[25]** et pB13 ou pWR1 (*Pseudomonas*) [7].

7 - Le pJP4 code pour la dégradation de l'herbicide 2,4-dichlorophenoxyacétate dans R. eutropha JMP134, le pP51 concerne le catabolisme du trichlorobenzène, le pAC27 est celui de la dégradation du 3-chlorobenzoate dans Pseudomonas putida AC866 (comme dans le pB13 qui lui est pratiquement identique).

De fortes homologies existent d'une voie à l'autre entre dioxygénases et cycloisomérases catalysant les deux premières étapes. La conversion des diènelactones [8] diffère davantage de celle de l'énol-lactone (voie du catéchol). On considère habituellement que la voie des chlorocatéchols s'est diversifiée à partir de celle du catéchol à une période ancienne qui est bien antérieure à la pollution de l'ère industrielle.

Réaction de la malélyl-acétate réductase

Les lactones, substrats des hydrolases

Le particularisme le plus accusé de la voie modifiée se présente au niveau des hydrolases qui ouvrent le cycle des lactones en formant un diacide. Les différentes enzymes examinées diffèrent par leur spécificité et les auteurs les ont classées en type I, II et III qui seront définis dans la section 9.8.

Pourquoi introduire ici la fluoro-muconolactone ? La question mérite une explication. On sait déjà que l'attaque du benzoate conduit au catéchol avec une seule étape intermédiaire. Les souches bactériennes capables de se développer sur benzoate sont très communes dans l'environnement. Celles qui dégradent le 4-fluorobenzoate le sont probablement aussi. Cette propriété a été observée dans diverses souches de *Ralstonia*, *Alcaligenes* et *Pseudomonas*, qui croissent sur ce substrat fluoré comme seule source de carbone et d'énergie. Assez curieusement, la plupart des bactéries mentionnées ne se développent pas sur les dérivés chlorés du benzoate. Pendant leur croissance sur 4-fluorobenzoate, elles induisent la voie *ortho* du catéchol, mais font aussi l'hydrolase et la réductase qui transforment les diènelactones dans la voie *ortho* modifiée. Autrement dit la fin de cette voie alternative est présente, alors que son début est absent. Il devient alors évident que la voie "standard" du catéchol (non halogéné) suffit à dégrader le 3-fluorocatéchol et le 3-fluoromuconate. Mais comment le fluor est-il éliminé ? Il semble qu'un départ de fluorure s'effectue spontanément au stade de la fluorolactone, soit au cours de drolyse, soit par passage à la *cis*-diènelactone. Celle-ci est alors facilement traitée par hydrolase et réductase. La transformation du 4-fluorobenzoate est illustrée par une figure.

---

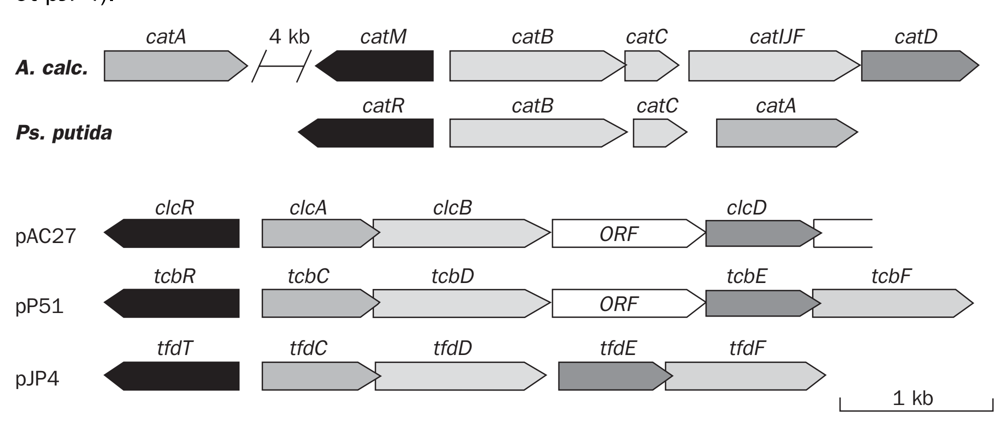
8 - Désignation abrégée pour cis- et trans-4-carboxymethylenebut-2-en-4-olides.

4-fluorobenzoate

Attaque du 4-fluorobenzoate

La présence d'enzymes de la voie *ortho* modifiée chez des germes qui n'en ont pas réellement besoin laisse imaginer que ces enzymes ont une autre fonction qui reste inconnue. La question se pose de l'apparition de ces voies dans l'évolution et de leur diversification dans les espèces compétentes. Un passage au crible exhaustif de toutes les propriétés génétiques, du répertoire des plasmides et des propriétés physiologiques des souches peut apporter des éléments de réponse. Pour la majorité des auteurs, la voie modifiée de l'oxoadipate s'est individualisée à une période très ancienne après une duplication des gènes de la voie standard, suivie de mutations dans des directions indépendantes. La pression sélective exercée par les pollutions modernes a pu accélérer ce processus en multipliant les recombinaisons et propagations par transposons ou plasmides.

Les homologies de séquence ne sont pas les seuls indices de parenté puisque la disposition des gènes dans les opérons est un autre critère de comparaison. La disposition relative des gènes révèle des analogies entre opérons chromosomiques (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida*) et plasmidiques (pAC27, pP51 et pJP4).



Fonctions enzymatiques	**Produits des gènes**
Protéines régulatrices	CatM, CatR, ClcR, TcbR, TfdT
Catéchol ou chlorocatéchol 1,2-dioxygénase	CatA, ClcA, TcbC, TfdC
Cyclo-isomérase	CatB, ClcB, TcbD, TfdD
Muconolactone isomérase	CatC (absente de la voie ortho modifiée)
Enol-lactone, ou diènelactone hydrolase (voie modifiée)	CatD, ClcD, TcbE, TfdE
Transférase, thiolase	CatI, CatJ, CatF
Maléyl réductase	TcbF, TfdF

Gènes de dégradation du catéchol et des chlorocatécols

Le maintien de l'ordre d'arrangement des gènes est un argument assez fort en faveur d'une diversification faite à partir d'une trame commune. Plusieurs auteurs considèrent que les plasmides ne font pas qu'accélérer la transmission des gènes d'une bactérie à une autre, mais favorisent l'accumulation de mutations. Au sein d'une population bactérienne, les cellules qui ont tiré le bon numéro obtiennent un avantage sélectif. En se divisant plus vite, elles prennent le pas sur les autres et répandent les gènes appropriés.

Le sigle ORF est expliqué en glossaire. On voit que la nomenclature des gènes est hétérogène, notamment au niveau des plasmides. Elle n'est détaillée ici que pour faciliter les recherches de documentation. On notera à nouveau l'orientation caractéristique des gènes régulateurs soulignés en noir par rapport aux opérons qu'ils commandent. Certaines flèches du schéma figurant les gènes semblent mordre légèrement sur la flèche suivante. Ce détail correspond à une situation réelle, où il y a un petit chevauchement entre séquences codantes. La traduction du premier gène s'interrompt, puis reprend légèrement en arrière avec un cadre de lecture distinct. Cette particularité n'est pas rare dans les génomes bactériens.

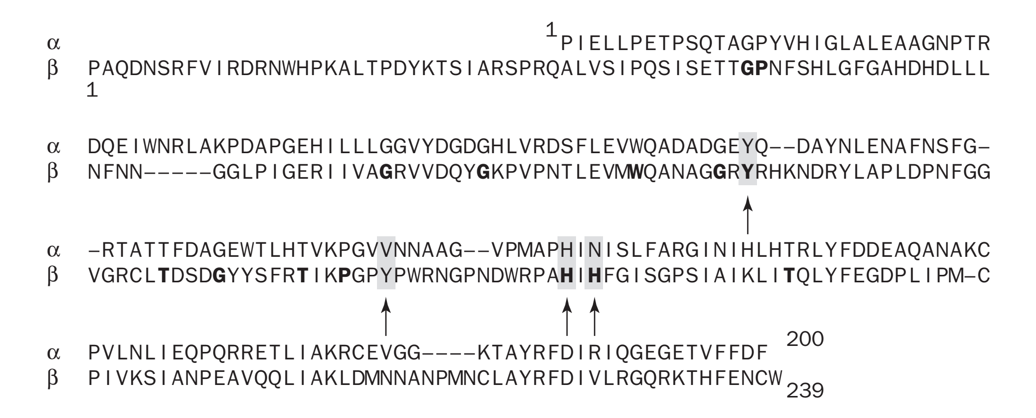
L'apparition de voies modifiées à partir d'un thème de base commun permet aux micro-organismes de collecter le flux métabolique en provenance de sources organiques variées, et d'étendre la gamme des biodégradations qu'ils peuvent effectuer.

9.5 - LES DIOXYGÉNASES ORTHO

L'ouverture du cycle aromatique par une dioxygénase occupe une place essentielle dans la biodégradation de nombreuses molécules aromatiques. Rappelons que la dioxygénation dite intradiol prépare la voie *ortho*, contrairement à la coupure extradiol relative à la voie *méta* étudiée au Chapitre 10. La réaction est la seule à exiger l'intervention du dioxygène jusqu'à l'entrée dans le métabolisme intermédiaire. Elle est souvent l'étape limitante. Toutes les dioxygénases *ortho* et *méta* contiennent du fer non héminique comme cofacteur essentiel, mais il y a des différences profondes entre les deux catégories. Une dioxygénase intradiol fonctionne avec Fe(III). Elle est codée en général par le chromosome et se montre le plus souvent assez spécifique. Le dioxygène ne se lie pas directement au métal, mais c'est le substrat qui le fait et devient plus réactif, donc plus fragile. Dans le cas de l'enzyme extradiol au contraire, le fer est à l'état de Fe(II), pouvant lier à la fois le substrat et O_2 côte à côte. Elle est souvent plasmidique et dotée d'une spécificité beaucoup plus étendue que dans le cas intradiol.

Les archétypes de dioxygénases intradiol sont la catéchol 1,2-dioxygénase, qui sera désignée comme catécholase, et la protocatéchuate 3,4 dioxygénase ou PCase. Ces enzymes ont leurs chaînes bâties sur le même modèle et renferment du fer(III). La catéchol 1,2-dioxygénase d'*Acinetobacter calcoaceticus* a deux protomères identiques et sa formule structurale est $(\alpha Fe)_2$. Chez d'autres espèces les protomères sont de type $\alpha\beta Fe$ et peuvent être au nombre de quatre ou davantage. Le dosage quantitatif de ces enzymes par mesure de la consommation d'O_2 est assez simple,

mais il est souvent plus commode d'utiliser l'absorption vers 260-270 nm de l'acide muconique et de ses dérivés, qui est beaucoup plus forte que celle du substrat de départ. Toutes les PCases connues sont constituées de protomères αβFe, en nombre variable d'une espèce à l'autre. Il y a deux chaînes distinctes dans le protomère, correspondant aux gènes *pcaH* et *pcaG*. L'enzyme de *Brevibacterium fuscum* a cinq protomères, contre 12 dans celle de *Pseudomonas putida.* La structure détaillée de celle-ci comme celle de *P. aeruginosa* a été publiée pour la première fois en 1988 **[26]**. Les 12 protomères sont disposés selon la géométrie du tétraèdre régulier avec trois axes de symétrie d'ordre 2 et quatre axes d'ordre 3 formant ainsi une boule creuse, soit 12 sites catalytiques répartis dans une masse totale de 587 kDa ! Les chaînes α (22,3 kDa) et β (26,6 kDa) présentent à la fois une homologie de séquence et une similitude d'organisation dans l'espace. Le fer est lié seulement par les chaînes β. La détermination de la structure détaillée de cette enzyme a été un progrès des connaissances tout à fait remarquable dans le domaine des dioxygénases.

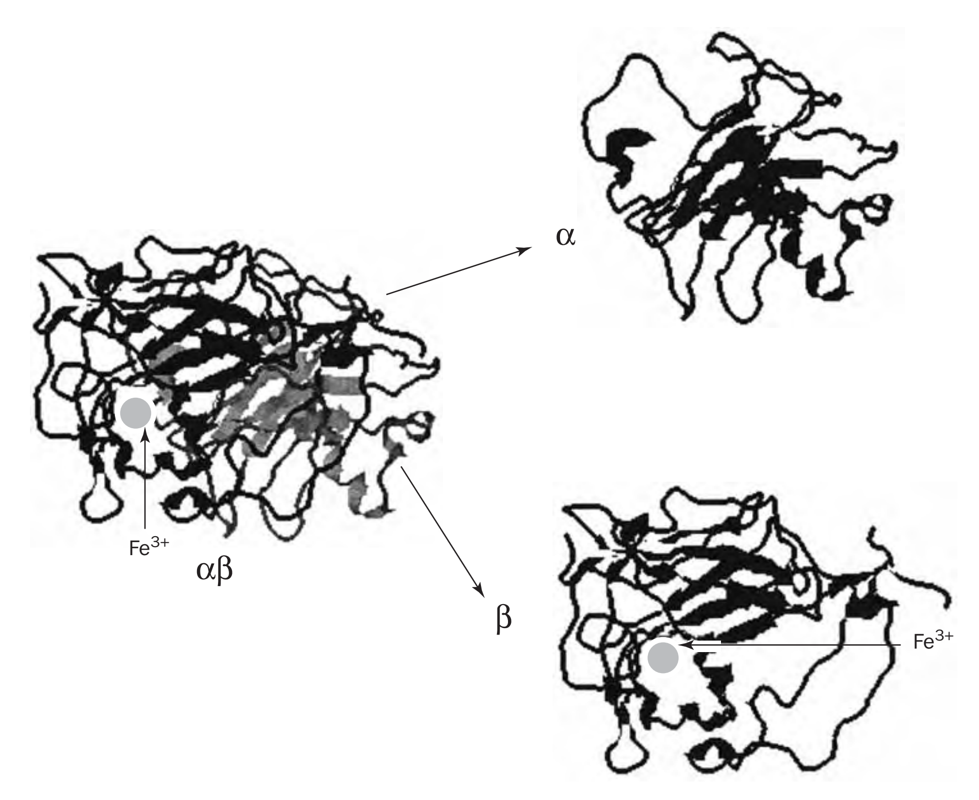


Alignement des séquences α et β de la Pcase (P. aeruginosa)

Les flèches verticales sous les séquences indiquent les 4 sites de liaison avec le fer : Y108, Y147, H160 et H162. Les sites en gras sont des positions conservées entre catéchol dioxygénases et Pcases. On voit que les chaînes β sont un peu plus longues dans la région N-terminale, car elles forment une sorte de bras émis par le protomère αβ pour enlacer un protomère voisin.

Un dessin de l'agencement général des deux chaînes partenaires dans un protomère suggère qu'elles se ressemblent. Elles ont une armature centrale de 9 barreaux (représentés par des flèches épaissies), bordés par de courtes hélices. Chose curieuse, le site actif renfermant un ion Fe^{3+} associé à la sous-unité β trouve son équivalent au niveau de la chaîne α, mais sans le fer, comme si le site de chaque β avait son image sur la chaîne α d'en face.

Ces données sont peut-être généralisables à d'autres Pcases puisqu'un *Acinetobacter* a donné lieu à des observations similaires **[27]**.



Dissociation d'une paire αβ de la PCase

Le fer est pentacoordonné selon une géométrie bipyramidale à base triangulaire [9].Les ligands essentiels déjà cités dans la séquence sont deux tyrosines (Y118, Y147) et deux histidines (H160, H162), la cinquième coordinence étant établie avec une molécule d'eau **[28]**. Dans le site équivalent mais dépourvu de fer des α, une tyrosine est remplacée par une valine, une histidine par une asparagine. L'origine d'un tel "pseudo-site" pose sur le plan de l'évolution un problème non résolu. Si la divergence des deux types de chaînes à partir d'une origine commune ne fait aucun doute, il est possible que les chaînes α aient perdu secondairement un ancien site catalytique pour ne garder qu'une fonction stabilisatrice.

Le fer n'est pas entièrement satisfait par sa sphère de coordinence, qui est généralement plus stable quand elle est complétée par une sixième liaison. L'édifice met à contribution une molécule d'eau, mais c'est un ligand faible et il en résulte autour du métal un environnement asymétrique qui ne fait qu'augmenter sa réactivité.

---

9 - *Comme deux pyramides soudées par leur base triangulaire, formant un hexaèdre à 5 sommets. Lorsque le fer est hexacoordonné, comme souvent dans les protéines héminiques, les deux pyramides ont une base carrée, et le polyèdre formé, un octaèdre, possède 6 sommets.*

Le fer dans la PCase

Simplifions par une image. Le métal va chercher à remplacer la molécule d'eau par un donneur organique (le substrat) et à s'adjoindre une sixième liaison de coordinence, le tout accompagné par un changement local de conformation dans la protéine. Le protocatéchuate est maintenu en place par une charge positive (arginine) et contracte une liaison avec le fer à haut spin par l'un de ses deux hydroxyles.

Les travaux de recherche très importants menés sur cette enzyme ont mis à contribution des méthodes spectroscopiques : RPE, RMN, MÖSBAUER. Par l'emploi de l'oxygène 17 et de la RPE, ORVILLE et LIPSCOMB ont pu démontrer que le substrat entrait en compétition avec H_2O pour se lier au métal. Ils en ont déduit un modèle réactionnel **[29]**. Le métal resterait ferrique tout au long du cycle et fonctionnerait sur le principe suivant : il commencerait par lier le substrat en le rendant plus réactif à l'oxygène, dont l'arrivée aboutirait à la formation transitoire d'un peroxyde sur le substrat. En désignant ce dernier par S :

$$E + S \longrightarrow ES \xrightarrow{O_2} ESO_2 \longrightarrow E + \text{produit}$$

Le peroxyde se décompose en un anhydride intermédiaire, qui s'hydrolyse en carboxymuconate emportant les deux atomes d'oxygène. Le modèle hypothétique représenté reste très schématique. Le principal aspect est l'activation du substrat par sa liaison avec le fer sur une seule des fonctions phénoliques (attachement dit *monodentate*)[10], et la combinaison ainsi formée devient capable de réagir avec l'oxygène **[30]**.

La Pcase est inactive sur le catéchol et se révèle comme une enzyme étroitement spécifique, ne transformant que le protocatéchuate et beaucoup plus faiblement l'homoprotocatéchuate (ou 3,4 phénylacétate). Porteur d'un seul hydroxyle, le 4-hydroxybenzoate est un inhibiteur compétitif. On a utilisé cette propriété pour faire cristaliser la protéine avec ce ligand en place et cartographier ainsi le site actif. L'utilisation des inhibiteurs en enzymologie apporte très souvent des renseignements sur le mécanisme enzymatique.

---

10 - Par opposition à une disposition « bidentate » où il y a deux liaisons sur atomes d'oxygène.

Le modèle hypothétique

On peut citer ici un dérivé de l'acide isonicotinique ou HINNO (acide 2-hydroxy-isonicotinique N-oxyde). Ce composé se lie fortement à la Pcase (le Ki est vers 10^{-7} M), la liaison avec le fer provoquant un changement de spectre d'absorption autorisant une véritable titration de l'enzyme **[31]**. Le dessin interprète cela par la similitude des états intermédiaires et suggère que le HINNO est un analogue de l'état de transition [11].

Analogie entre protocatéchuate et HINNO

Les rapports de la PCase avec des ligands variés a servi de bon terrain d'étude. Ainsi chez *Acinetobacter*, l'enzyme ne reconnaît pas le catéchol. Le groupe carboxylique est donc nécessaire. L'enzyme modifiée par mutation se met à transformer le catéchol. La mutation permet aux bactéries de croître sur benzoate même si la catéchol dioxygénase est inactivée **[32]**. La modification nécessaire de la Pcase est relativement mineure et laisse deviner comment des mutations survenues dans les populations microbiennes permettent à celles-ci de s'adapter à des substrats nouveaux.

---

11 - Voir éventuellement en glossaire des rappels sur "état de transition" et "inhibiteur compétitif".

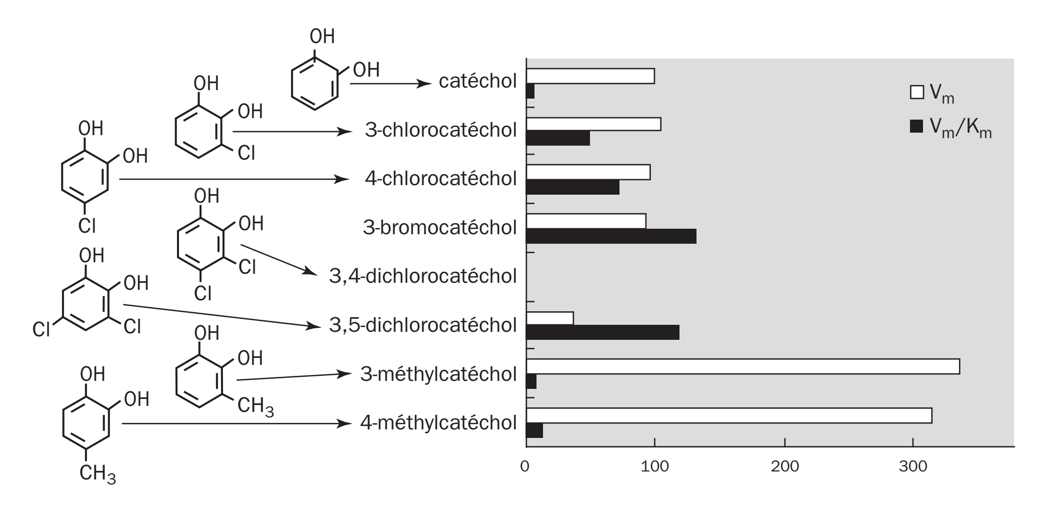
Qu'en est-il de la catéchol 1,2-dioxygénase (ou catécholase), qui est très répandue dans la nature car le catéchol est un carrefour métabolique important. Elle est généralement sans activité notable sur le protocatéchuate, mais elle fonctionne sur le même principe que la Pcase. La question est de savoir comment la catécholase peut s'accommoder de la présence de substituants du type halogène sur le cycle aromatique. Ils peuvent affecter la catalyse enzymatique de deux manières, soit en modifiant l'affinité de la protéine pour le substrat (changement de coefficient K_m), soit en perturbant la vitesse du mécanisme (changement de la constante k_{cat}). Dans le premier cas, l'affinité pour le substrat peut s'effondrer verticalement lorsque les substituants sont trop encombrants pour autoriser l'accès au site catalytique, ou au contraire être renforcée si des liaisons supplémentaires sont contractées avec la protéine. Dans ce dernier cas, la présence d'un substituant change l'équilibre électronique du cycle aromatique et modifie sa réactivité. Il en résulte des effets éventuellement contradictoires allant de l'inhibition à l'activation. La catécholase produite en abondance par *Pseudomonas* B13 ou *Ralstonia eutropha* B9 cultivés sur benzoate a offert un cadre favorable à l'analyse **[33]**. La situation est en gros la suivante. Pour attaquer des substrats chlorés, les bactéries ont à leur disposition deux **dioxygénases I** et **II** (des iso-enzymes). La **catécholase I** est assez étroitement spécifique, et attaque beaucoup plus efficacement le catéchol que ses dérivés. Au contraire la **catécholase II** est peu exigeante et s'accommode volontiers des catéchols substitués, tout en ayant une action plus lente que celle de la catécholase I. En somme la contrepartie d'une sélectivité plus étendue est une activité catalytique moins efficace.

La nature et la position des substituants sur le cycle ont donc une influence déterminante sur la vitesse de dioxygénation. Le mécanisme est fondé sur l'attaque du cycle aromatique par O_2 lorsque le substrat est déjà lié au fer. L'attaque est électrophile [12], elle sera affaiblie si le substituant est attracteur d'électrons, ou au contraire facilitée dans le cas d'un groupe donneur. Les chimistes tentent de prévoir l'action d'un substituant par la fonction de HAMMETT, dont une idée succincte est donnée en glossaire. Chaque type de substituant se voit affecter une constante de HAMMETT notée σ, un paramètre destiné à faire un pronostic sur la réactivité de la molécule. En gros le chlore, qui a un caractère attracteur, correspond à un σ positif, car il rend le cycle moins réactif à une attaque électrophile par O_2. Les valeurs négatives correspondent à un substituant donneur, dont un exemple est le groupe méthyle. La constante de Hammett n'est généralement utile que lorsqu'il faut comparer la réactivité de composés de même structure, mais porteurs de substituants différents : 3-méthylphénol, 3 -chlorophénol, 3-hydroxyphénol (résorcinol). L'influence des substituants sur la réactivité du noyau aromatique est en général largement traitée dans les ouvrages de chimie organique.

Voici quelques exemples concernant la catécholase II de *Pseudomonas* B13. L'enzyme a contrairement à la catécholase I une spécificité élargie. L'activité sur le catéchol et quelques dérivés est comparée à l'aide des coefficients cinétiques V_m et K_m.

---

12 - Le substrat joue le rôle de base de LEWIS, le fer celui de l'acide.



La valeur de $\mathbf{V_m}$ est indiquée sur le diagramme par les barres blanches. Elle correspond à la vitesse maxima atteinte évaluée en unités arbitraires qui dépendent des conditions opératoires. On lui donne la valeur de référence 100 dans le cas du catéchol (voir *V_m, K_m, MICHAELIS**). Nous voyons qu'en apparence il n'est pas le meilleur substrat puisque les valeurs pour les dérivés méthylés sont au moins triples. En apparence seulement. Pour comparer valablement l'efficacité de l'enzyme sur les divers substrats, il faut aussi faire intervenir le coefficient K_m, qui indique si la protéine piège fortement son substrat ou non. L'affinité de liaison est généralement d'autant plus forte que le K_m est plus faible. Une enzyme peut donc lier fortement un substrat mais le transformer lentement (V_m faible), ou au contraire avoir un pouvoir catalytique considérable mais s'avérer peu efficace car son coefficient K_m est élevé (faible affinité apparente). Le K_m de la catécholase II pour le catéchol est 15,6 µM, alors qu'il est seulement de 0,7 µM pour le bromocatéchol, par exemple. Conséquence : celui-ci est mieux retenu par l'enzyme que le catéchol. Il en est de même pour les 3- et 4-chlorocatéchols. Les meilleures comparaisons s'effectuent donc par le rapport $\mathbf{V_m/K_m}$ (barres noires du graphique). Vus sous cet angle, les catéchols halogénés, à l'exception du 3,4-dichlorocatéchol où la valeur de V_m est à peu près nulle, sont de meilleurs substrats que le catéchol ou ses deux dérivés méthylés. Cependant l'étude complète et rigoureuse d'un tel système nécessite en général une expérimentation assez lourde où il faut faire intervenir le pH, la cinétique, l'inhibition par les produits de la réaction.

9.6 - DÉSHALOGÉNATION AÉROBIE AVEC OUVERTURE DU CYCLE

La rupture de la liaison carbone-halogène est une phase critique de la dégradation des haloaromatiques. On observe deux stratégies différentes. Le premier cas sera le seul abordé dans cette section et concerne le remplacement de l'atome d'halogène sur le cycle par un hydroxyle ou un atome d'hydrogène. Dans le second cas, la déshalogénation n'aura lieu qu'après l'ouverture du cycle au cours d'une étape ultérieure du métabolisme.

Nous prendrons deux exemples. Le premier est celui du 2-chlorophénol. Il est attaqué fortuitement par la salicylate hydroxylase de *Pseudomonas putida* **[34]**. L'enzyme est une mono-oxygénase flavinique fonctionnant de la même façon que la 4-hydroxybenzoate hydroxylase entrevue dans le chapitre antérieur (section 6). Le salicylate est un produit banal du monde végétal, et il est remplaçable ici par le 2-chlorophénol. Il se forme dans les deux cas du catéchol comme produit de la réaction.

OH
COO⁻ H⁺
salicylate
O_2 H_2O
NADPH H^+ → $NADP^+$ CO_2
OH OH
H_2O O_2
2 $NADP^+$ ← 2 NADPH 2 H^+
Cl^-
OH Cl
2-chlorophénol

Réactions de la salicylate hydroxylase

Pourquoi deux molécules de NADPH sont-elles nécessaires quand le 2-chlorophénol est substrat ? L'explication tient à l'apparition de l'ion chlorure. Le chlore fixé au noyau benzénique remplace théoriquement un proton et devrait quitter les lieux au degré d'oxydation + 1 (Cl^+). La formation du chlorure correspond donc à une réduction supplémentaire à deux électrons. La réaction se ferait en deux temps. La première étape serait l'hydroxylation proprement dite et conduirait à un intermédiaire cationique porteur de deux hydroxyles où l'halogène est encore sur le noyau. La deuxième se déroulerait sans intervention d'O_2 comme le ferait une réductase : le cycle hydroxylé perd l'équivalent de Cl^+ en devenant du catéchol, et l'halogène est réduit en ion chlorure par la deuxième paire d'électrons.

Le deuxième exemple est plus compliqué car il s'agit de la biodégradation du pentachlorophénol ou PCP, un ingrédient bactéricide et fongicide. Ce composant a été produit en quantité énorme comme agent protecteur du bois, conjointement à la créosote et aux arsenicaux. Le PCP est injecté sous pression au bois destiné à résister aux agents extérieurs (poteaux télégraphiques, traverses de chemin de fer, charpentes). Il est légèrement volatil, insoluble dans l'eau, mais son sel de sodium est soluble. Malheureusement il est toxique, s'élimine lentement de l'environnement et contient des dioxines comme impuretés. La combustion du bois traité libère davantage de dioxines. Ces défauts ont conduit à l'arrêt de sa production dans la communauté européenne et à des limites sévères imposées à son usage. De nombreux sites industriels et anciennes décharges sont encore lourdement contaminés. Or les aromatiques multi chlorés sont généralement les plus difficilement biodégradables. Bien que le PCP soit totalement artificiel et apparu seulement depuis 1936, la flore bactérienne de l'environnement a pu s'y adapter. Certaines souches pratiquent la déchloration partielle du noyau, d'autres vont jusqu'à la minéralisation complète **[35]**. La dégradation aérobie du PCP la mieux connue a été analysée chez *Sphingomonas chlorophenolica*. Son principe est le suivant **[36]** :

Il est constaté que trois atomes de chlore sur cinq sont éliminés en chlorure sans qu'il y ait ouverture du cycle. La réaction **1** est celle de la PCP hydroxylase :

PCP + 2 NADPH + O_2 ⟶ TétraCHQ (tétrachlorohydroquinone) + 2 $NADP^+$ + Cl^- + H_2O

L'apparition transitoire d'une *p*-hydroquinone est caractéristique de la dégradation des phénols poly-halogénés. Il faut 2 NADPH pour effectuer cette première conversion comme dans l'exemple précédent. L'enzyme est là aussi une flavoprotéine. L'hydroxylase de *Flavobacterium* est peu spécifique, et peut agir sur des substrats où un halogène porté par le cycle est remplacé par un atome d'hydrogène, un hydroxyle ou d'autres substituants, tels que des groupes nitro, amino et cyano **[37]**. Au lieu d'enlever un ion halogénure, la réaction élimine respectivement un proton, un ion nitrite, l'hydroxylamine (NH_2OH), ou un ion cyanure. Il faut 2 NADPH pour chaque hydroxylation, sauf pour le groupe amino et l'hydrogène. Le 2-iodophénol est également substrat de l'enzyme, et deux molécules de NADPH sont oxydées par mole de substrat. Une première oxydation du cycle engendre une benzoquinone tandis que l'iode est éjecté sous forme d'iodure. La deuxième phase réduit à nouveau la benzoquinone, dont la présence transitoire a été détectée. La réaction de l'hydroxylase est relativement lente et constitue le goulot d'étranglement du métabolisme des phénols halogénés. Le PCP en est peut-être un substrat accidentel de l'enzyme, dont les substrats naturels n'ont pas été formellement identifiés. Un détournement contre des produits artificiels, en quelque sorte.

Les deux étapes suivantes (**2** sur le schéma) sont catalysées par la tétrachloro-hydroquinone (TCHQ) déshalogénase. L'étape **3** est celle de la 2,6-dichloro-hydroquinone dioxygénase. Le principe est tout à fait différent et suggère là aussi un détournement d'enzyme préexistante. Les deux étapes **2** font appel au glutathion (GSH) comme cofacteur.

Déshalogénation réductrice par glutathion

Une déshalogénation réductrice, qui remplace Cl par H, est rare chez les organismes aérobies, et se présente surtout chez les anaérobies. La fonction générale du glutathion est rappelée en glossaire. Toutes les protéines qui l'utilisent ont des ressemblances au niveau du site actif et sont présumées fonctionner de la même manière. Le départ du chlorure fait intervenir ici successivement deux molécules de glutathion.

Le même principe se retrouvera dans l'élimination de certains herbicides. La glutathion S-transférase est répandue chez les bactéries, les champignons et les mammifères. Elle participe au métabolisme de la tyrosine ou du phénylacétate :

tyrosine
COO^-
CH_2
OH
HO
homogentisate
COO^-
CH_2
phénylacétate
H_2C COO^- O COO^-
H_2C COO^- O COO^-
fumarate
^-OOC COO^-
H_2C COO^-
H_3C O
acétoacétate

Isomérisation et scission

La TCHQ déshalogénase de *Sphingomonas* peut catalyser l'isomérisation du produit intermédiaire, le maléylacétoacétate, qui est indiquée par le cadre rectangulaire. C'est un autre argument pour supposer que la dégradation du PCP aurait été "mise au point" par sélection à partir de voies métaboliques déjà existantes. La première pièce est l'hydroxylase, une enzyme peu spécifique et catalysant l'étape limitante, peut-être initialement prévue pour attaquer le 2,6-dichlorophénol. La suppression de l'enzyme après mutation fragilise énormément les bactéries au PCP. La contamination du sol par cet ingrédient a dû créer une forte pression sélective permettant aux bactéries de se débarasser du composé toxique. L'hydroxylase est induite par le PCP et probablement par d'autres phénols. La deuxième pièce est la tétraHQ déshalogénase à glutathion, visiblement récupérée du métabolisme des acides aminés aromatiques. Elle est constitutive, une situation jugée peu économique car en absence de substrat l'enzyme est fabriquée en pure perte. Elle serait née par adaptation d'une protéine normale du métabolisme sans avoir eu le temps de se faire accompagner d'un système régulateur. La dioxygénase terminale, qui scinde la dichloro-hydroquinone formée, est induite par le PCP et possède aussi ses bases naturelles, car l'hydroquinone halogénée est analogue à des produits formés par des champignons basidiomycètes au cours de la dégradation de la lignine.

En somme les trois pièces maîtresses, l'hydroxylase, la déshalogénase réductrice et la dioxygénase, auraient été recrutées après modification et sélection, permettant aux bactéries de résister à un composé toxique entièrement artificiel et de le dégrader complètement, au point de pouvoir se développer sur lui comme seule source de carbone et d'énergie !

9.7 - LES CYCLO-ISOMÉRASES

La cyclo-isomérisation du *cis,cis*-muconate est une étape essentielle de la voie *ortho* du catéchol. La cyclo-isomérase de *Ralstonia eutropha* pJP4 (ou muconatase, CatB) a été cartographiée par rayons X à 3 Å de résolution **[38]**, et celle de *Pseudomonas putida* à 1,85 Å seulement **[39]**. L'action catalytique dépend d'un ion manganèse dans chacune des 8 sous-unités identiques que la protéine renferme. La réaction de cyclisation est essentielle à toute la voie *ortho*. Le modèle réactionnel considéré comme plausible est celui de GERLT et GASSMAN et conduit à une muconolactone **[40]**. Les chimistes trouveront dans l'article de ces auteurs un traitement en profondeur de l'enlèvement d'un proton au voisinage d'une fonction carboxylique, conduisant à ce que les enzymologistes appellent une bêta-élimination.

+H :B
H–B+
:B
O
O−
O−
O
Mn2+
H
A
rapide
O
O
O−
O
H
A−
Mn2+
lent
O
O
H
H
O−
O
Mn2+
H
A

Mécanisme de la lactonisation du muconate

Le *cis,cis*-muconate à gauche du schéma est porteur de deux fonctions carboxyliques disposées symétriquement. La structure générale est plane par suite de la délocalisation des électrons π dans la molécule. Le muconate chargé à ses deux extrémités est tendu entre deux charges positives portées sur lysine (non représentées). La transformation du muconate nécessite l'apport d'un proton sur un site accepteur basique "**:** B", et la présence d'un site "AH" donneur de proton. La muconolactone, à droite, offre une situation différente où le groupe méthylène ($–CH_2–$) qui relie la fonction acide au cycle possède un carbone tétraédrique. Quand la réaction s'effectue, l'acquisition d'un proton supplémentaire ne se fait pas sur n'importe quelle face du plan. Le côté où cette addition s'effectue est imposé par la géométrie du site enzymatique. L'opération engendre un coude dans la structure moléculaire et fait basculer le carboxyle au-dehors du plan. Ce n'est pas tout. Comme la fermeture du cycle lactone supprime une charge négative, elle efface du même coup un pont salin, et rend tétraédrique une deuxième position carbonée. Il en résulte une torsion supplémentaire par rapport à la position d'origine. La perte d'une charge négative et la disparition d'un pont salin est susceptible d'amoindrir l'efficacité du verrouillage de la petite molécule dans le site catalytique. C'est peut-être la raison pour laquelle la muconolactone est liée moins efficacement par l'enzyme que le muconate, ce qui a pour effet de faciliter son départ et de déplacer l'équilibre réactionnel en sa faveur.

Cette discussion a fait état d'un apport de proton selon une direction rigoureusement déterminée. Elle se fait d'après les règles de nomenclature en direction *syn* (4S), et ce petit détail a son importance car l'orientation est conservée par les différentes cyclo-isomérases bactériennes à manganèse examinées. Une évolution aurait pu se faire à partir d'un même modèle ancestral auquel appartiendrait aussi la mandélate racémase **[41]**. Celle-ci fonctionne avec un cation divalent occupant une position comparable, et sa structure ressemble de façon surprenante à celle des cyclo-isomérases. En somme le même modèle aurait servi au cours de l'évolution pour produire des enzymes catalysant des réactions différentes tout en conservant le mécanisme de base.

muconate cyclo-isomérase

et

mandélate racémase

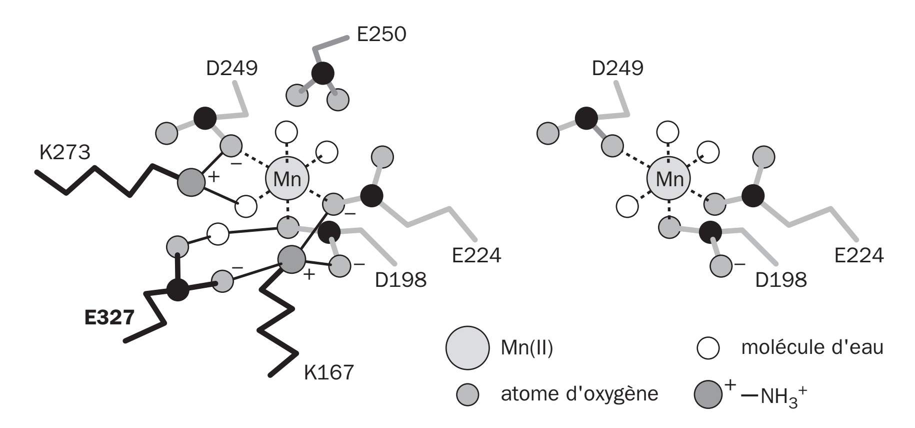
Deux enzymes apparentées par leur structure et leur mécanisme

Grâce au modèle moléculaire détaillé de la cyclo-isomérase chez un *Pseudomonas*, il a été possible d'identifier la position précise des sites impliqués dans la catalyse. Le groupe acide AH est un glutamate (E327), maintenu fermement en place par des ponts ioniques. Le site basique **:** B est une lysine (K169). Cette lysine, une fois protonée, décharge un proton perpendiculairement au plan initial du muconate, et explique l'addition stéréospécifique *syn* de ce proton qu'on avait déjà décelée avant parution de l'analyse cristallographique. À première vue, les bactéries n'ont pas l'exclusivité de ce type d'enzyme. Des champignons capables de métaboliser des phénols et catéchols (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Trichosporon cutaneum*) utilisent des cyclo-isomérases dotées de la même stéréospécificité. Un même modèle aurait-il existé pour les eucaryotes ? L'examen de la muconatase de *T. cutaneum* suggère qu'il n'en est rien **[42]**. Les enzymes eucaryotiques n'ont pas besoin de métal et leur séquence ne révèle apparemment aucune similitude convaincante avec celles des cyclo-isomérases bactériennes. Il s'agit d'une évolution convergente.

La réaction globale de la cyclo-isomérase étant réversible, l'enzyme peut théoriquement repartir de la lactone pour faire du muconate. Mais la rétention de la muconolactone est plus faible comme il a été déjà signalé, ce qui freine sa conversion inverse en muconate. La transformation de celui-ci en muconolactone est donc unidirectionnelle en apparence, indépendamment de la constante d'équilibre entre ces deux formes.

Que fait le manganèse ? En principe un ion métallique au sein d'une protéine peut avoir quatre fonctions majeures : servir comme donneur ou accepteur d'électron dans une oxydoréduction, participer directement à la catalyse comme acide de

LEWIS, faciliter la fixation du substrat dans le site enzymatique par une ou plusieurs *coordinences*, ou tout simplement participer à la stabilité générale de l'édifice protéique. La première utilisation attire tout de suite l'attention car le *manganèse** peut changer de degré d'oxydation, mais elle semble à écarter ici car la réaction catalysée par l'isomérase n'est pas une oxydoréduction. Les ions Mn^{2+} sont connus par ailleurs comme cofacteurs de diverses enzymes, parfois remplaçables par d'autres ions comme Mg^{2+}, Co^{2+} ou Zn^{2+}. Au cours du cycle catalytique, ces ions sont placés au contact du substrat et y déstabilisent certaines liaisons. Cette fonction est à écarter dans le cas de la muconate cyclo-isomérase, parce que l'analyse structurale et les propriétés spectrales du manganèse montrent qu'il est situé trop loin du lieu de la catalyse. Son rôle apparaît comme essentiellement stabilisateur : il consisterait à consolider la formation d'une poche hydrophile dotée de la géométrie requise.



L'environnement du manganèse

Le manganèse de la muconate cyclo-isomérase est encastré dans une fissure hydrophile à proximité immédiate du site catalytique, à l'intérieur d'une structure dite en barillet. L'ion métallique a une géométrie de coordination octaédrique (6 sommets) évoquée par le dessin. Trois liaisons seulement sur six sont établies avec des molécules d'eau. Les autres liaisons le sont avec des fonctions carboxyliques (D198, E224, D249). Dans cet environnement polaire, le glutamate E327 joue un essentiel et correspond à l'acide AH de la figure du mécanisme. Sa position est certainement cruciale et serait stabilisée en partie par le métal, lequel maintient l'existence d'une région hydrophile consolidée par un réseau important de liaisons polaires. Le manganèse établirait autour de lui une architecture hydrophile rigide essentielle au mécanisme catalytique. Sans sa présence, le site hydrophile aurait tendance à se retourner comme un doigt de gant vers le solvant. La cyclo-isomérase présente donc un cas assez rare où le manganèse n'aurait essentiellement qu'une fonction stabilisatrice alors qu'on l'attendait plutôt comme un pôle réactif participant à la catalyse **[43]**.

Une autre surprise vient confirmer cette façon de voir. La situation apparaît comme différente dans l'enzyme de lactonisation du carboxy-*cis*,*cis*-muconate (PcaB) intervenant dans la transformation du protocatéchuate. Pour s'y retrouver rapidement :

Substrat initial	Produit	Lactonisé par	Produit
Catéchol	muconate	"muconatase" (CatB)	Muconolactone
Protocatéchuate	3-carboxy-muconate	"carboxy-muconatase" (PcaB)	Carboxy-muconolactone

Bien que les deux cyclo-isomérases catalysent des réactions très similaires au carboxyle près, il s'est avéré qu'elles sont profondément différentes chez *Pseudomonas putida* dans leur mécanisme **[44]**. La muconatase effectue une addition "*syn*", alors que la carboxy-muconatase fait une addition "*anti*". En outre il n'existe aucune homologie significative entre les séquences de ces deux protéines.

La lactonisation : les deux orientations

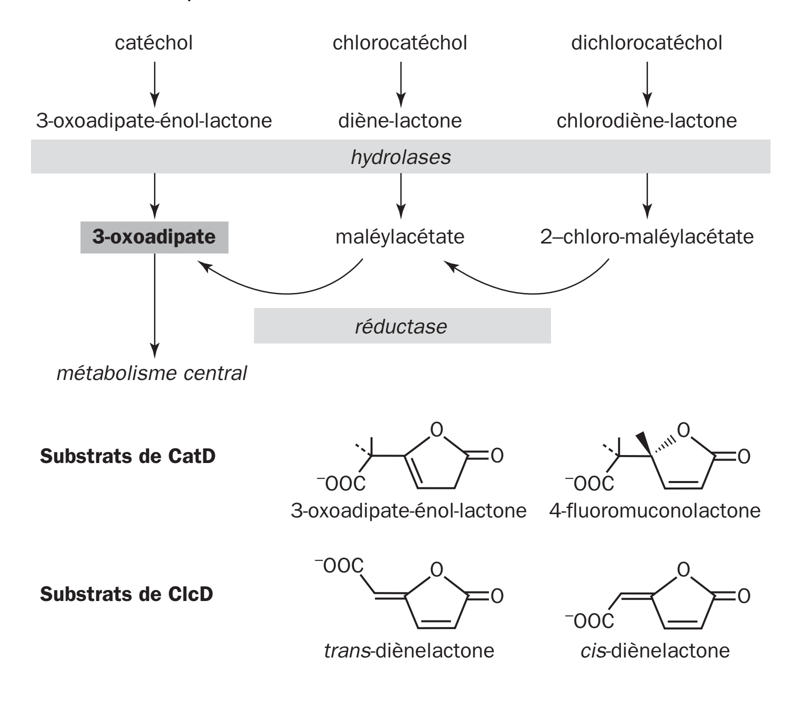
La stéréochimie liée à la catalyse des enzymes est généralement fort stricte et tient évidemment à la disposition des éléments du site actif dans l'espace. Lorsqu'une différence est constatée comme ici, on peut affirmer pratiquement à coup sûr que les deux protéines du même organisme sont étrangères l'une à l'autre sur le plan structural, même si les mécanismes réactionnels sont les mêmes. La cyclo-isomérase PcaB de *P. putida* aurait été recrutée d'une famile d'enzymes contenant la fumarase **[45]**, dont la mission est de catalyser l'interconversion du fumarate et du malate dans le cycle de KREBS. Le passage du fumarate au malate est également une addition *anti* sur la double liaison, l'hydroxyle venant d'une molécule d'eau étant apporté d'un côté, un proton de l'autre. Or il existe un grand conservatisme de séquence pour cette protéine. La muconate cyclo-isomérase de la voie du catéchol, aurait suivi une évolution différente au sein de la famille de la mandélate racémase, qui avait adopté le mécanisme *syn* plutôt que la solution *anti*.

La voie *ortho* est aussi présente chez les champignons et levures. La carboxy-muconate cyclo-isomérase a été étudiée chez *Neurospora* crassa, *Aspergillus niger* et une levure (*Trichosporum cutaneum*) **[46]**. Dépourvue de métal, l'enzyme de *Neurospora* fonctionne néanmoins comme la muconatase bactérienne, c'est-à-dire en utilisant un mécanisme *syn*. Pourtant il n'y a pas d'homologie avec cette protéine. Il n'y a pas d'indication claire d'une quelconque parenté entre les voies *ortho* des procaryotes et des eucaryotes.

La dichotomie *syn/anti* dont il a été question intrigue beaucoup les enzymologistes. On en vient à l'idée que la vaste diversification des modèles enzymatiques s'est faite à l'origine sur un très petit nombre de structures de base conservant une orientation asymétrique imposée. La voie *ortho* est certainement très ancienne. Les différentes protéines comme celles que nous avons examinées semblent avoir été recrutées à partir de modèles pré-existants. Cette opération a pu se produire plusieurs fois à partir de sources différentes. La nouvelle protéine aurait emporté chaque fois l'empreinte structurale de la protéine mère, en conservant son mécanisme et ses orientations fondamentales. Le recrutement a pu se réaliser par duplication de gène. Les deux exemplaires aurait évolué séparément pour leur propre compte au gré des mutations et de la pression sélective. L'une des lignées aurait conservé la même fonction dans la voie métabolique d'origine, la seconde aurait été détournée vers une fonction nouvelle.

9.8 - HYDROLASES ET RÉDUCTASES DES VOIES ORTHO

Une étape importante des voies conduisant au 3-oxoadipate est catalysée par une hydrolase. Dans le métabolisme du catéchol, l'hydrolase est CatD et engendre directement le 3-oxoadipate. Dans la dégradation des chlorocatéchols intervient **ClcD**, qui ne produit pas l'oxoadipate mais un maléylacétate (il y a une double liaison en plus). Il faut une réaction supplémentaire catalysée par une réductase pour atteindre l'objectif. Les substrats des hydrolases sont de nature différente dans la voie normale et la voie modifiée, puisque CatD attaque une énol-lactone, au lieu d'une diènelactone pour ClcD.



Un analogue fluoré de la 3-oxoadipate-énol-lactone (ou muconolactone) a été signalé ici, car il permet de tester les propriétés des hydrolases produites par différentes espèces. La 4-fluoromuconolactone [13] est produite par *Ralstonia* à partir du 4-fluorobenzoate, qui se voit transformé en 3-fluorocatéchol, puis en 3-fluoromuconate **[47]**. Cette voie est une parenthèse intéressante ici, car nous avons vu que l'halogène était éliminé par lactonisation dans le cas du chlore, du brome et de l'iode. Le fluor est donc un cas particulier. Certaines diènelactone hydrolases peuvent être différenciées par leur spécificité en types I, II et III, comme l'indique le tableau. Le signe + signale une forte activité, le signe – une activité négligeable ou nulle.

Enzyme et source (d'après SCHLÖMAN*)* **[48]**	*Substrats convertis*				*Inhibée par* [14]	
	3-oxoadipate énol-lactone	*trans-diènelactone*	*cis-diènelactone*	*4-fluoro-muconolactone*	*pCMB*	*EDTA*
3-Oxoadipate énol-lactone hydrolase (a)	+	–	–	+	+	
Diènelactone hydrolase, type I (b)	+	+	–	+	+	+
Diènelactone hydrolase, type II (c)	–	–	+	–	–	–
Diènelactone hydrolase, type III (d)	–	+	+	+	+	–
Diènelactone hydrolase, de *Rh. er.* (e)	–	–	+	–	+	–

Organismes : (a) *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida*, pJP4
(b) *Ralstonia eutropha* 335, H16 et plasmide JMP222
(c) *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*
(d) *Pseudomonas sp.* B13, plasmides pAC27
(e) *Rhodococcus erythropolis* (un actinomycète)

Nous avons vu que les métabolismes du catéchol et de ses dérivés halogénés suivent deux voies parallèles. La parenté entre les hydrolases des énol-lactones et diènelactones, si elle n'est pas exclue, apparaît beaucoup plus lointaine que dans le cas des dioxygénases et cyclo-isomérases. Si la diènelactone hydrolase n'a pas de parenté évidente avec l'hydrolase de la voie ortho "normale" se pose alors la question de son origine dans l'optique qui voudrait voir le métabolisme des chlorocatéchols comme l'adaptation d'une voie déjà existante. Une possibilité est l'emprunt d'un gène d'une source complètement indépendante, codant pour une protéine non prévue pour participer à la dégradation des halo-aromatiques. Cependant la diènelactone hydrolase est présente dans des souches inaptes à croître sur chloro-aromatiques, comme *Burkholderia cepacia* dans le tableau précédent. Il existe donc des bactéries qui possèdent l'hydrolase sans être capables de dégrader le chlorocatéchol. La question reste non résolue. Les lactones sont des esters

13 - Exactement la (+)-4-carboxyméthyl -4-fluoro-but-2-ène-4-olide.

14 - pCMB : para-chloromercuribenzoate (réactif des thiols) ; EDTA : éthylène diamine tétraacétate (complexant des ions métalliques divalents).

cycliques internes. Les hydrolases qui les attaquent sont donc des estérases, groupe très important où se rencontrent par exemple les protéases à sérine. Les diènelactone hydrolases sont aussi des estérases à sérine, mais ne montrent aucune parenté avec ces protéases.

Les enzymes bactériennes de la voie *ortho* modifiée jusqu'à l'hydrolase incluse sont généralement codées par un plasmide. Par contre la réduction du maléylacétate en oxoadipate dépend du chromosome. Contrairement à ce qu'on pourrait penser, le maléylacétate est un métabolite important dans la nature et n'a rien de marginal. Les champignons en font au cours de la destruction de la lignine. Plusieurs voies convergent vers le 1,2,4-trihydroxybenzène (catéchol avec un OH supplémentaire). Une dioxygénase intradiol le transforme directement en maléylacétate dont la réduction en 3-oxoadipate est une étape clé commune aux bactéries et aux champignons. Les enzymes concernées ne présentent aucune parenté.

La maléylacétate réductase bactérienne a été purifiée de plusieurs sources, dont *Ralstonia eutropha* pJP4 **[49]**. L'enzyme utilise NADH comme réducteur favori, réduit aussi et déchlore le 2-chloro-maléylacétate (en utilisant 2 NADH par mole). Elle a été purifiée et caractérisée aussi chez une levure, *Trichosporon cutaneum* , où elle apparaît comme un dimère de sous-unités de 40 kDa **[50]**.

9.9 - DÉSHALOGÉNATION AÉROBIE APRÈS OUVERTURE DU CYCLE

Un cycle aromatique halogéné est susceptible d'être ouvert par dioxygénation, pourvu que l'enzyme qui la catalyse puisse s'en accommoder. Il existe de nombreux cas particuliers. Les substrats les plus faciles à attaquer ne comportent pas plus de deux atomes d'halogène qui peuvent se voir éliminés au cours d'une étape ultérieure.

Phénols monochlorés

Dans le cas contraire se forment des intermédiaires halogénés récalcitrants susceptibles de s'accumuler dans le milieu environnant lorsqu'ils ne peuvent pas être attaqués par une autre voie. Contrairement aux phénols fortement polyhalogénés comme le PCP, où les atomes d'halogène sont enlevés un à un par hydroxylation ou par réduction, les mono- et dichlorophénols sont transformés en un catéchol, et le chlore n'est éliminé qu'après ouverture du cycle.

Les trois monochlorophénols de la figure sont d'abord hydroxylés en 3- et 4-chlorocatéchols **[51]**. Ce mécanisme est présent dans *Pseudomonas* B13, le 3-chlorophénol (3-CP) étant hydroxylé en deux chlorocatéchols distincts. Les *Nocardia* et *Rhodococcus* ne font que le 4-chlorocatéchol (ligne du bas) **[52]**. Chez certains *Pseudomonas*, l'hydroxylation des chlorophénols se fait par leur toluène dioxygénase **[53]**. De façon générale l'hydroxylation des chlorophénols se fait selon des modalités variées avec les espèces en utilisant une ou plusieurs hydroxylases plus ou moins sélectives. La coupure du chlorocatéchol formé est une étape critique et donne un chloromuconate. La grande majorité des organismes capables d'entamer un chlorocatéchol le font ainsi par la voie *ortho*. La coupure *méta*, catalysée par une catéchol 2,3-dioxygénase, existe aussi, mais conduit en général à la formation d'un chlorure d'acide qui est inhibiteur en bloquant le site de l'enzyme par acylation.

La **cyclo-isomérisation** du chloromuconate (ou lactonisation) élimine le substituant chloré pour donner, selon la nomenclature officielle rébarbative le 4-carboxyméthylènebut-2-ène-4-olide. Il y deux isomères, *cis* et *trans*, comme déjà aperçus dans la voie ortho modifiée. Cette étape est cruciale et mérite un petit rappel. Le croquis indique la transformation du catéchol (non chloré) en *cis,cis*-muconate, puis en muconolactone.

catéchol → COO⁻ COO⁻ / ⁻OOC COO⁻ ⇌ (H⁺) H O O ⁻OOC

cis,cis-muconate (4S)-muconolactone

La formule du muconate a été représentée de deux façons différentes [15]. La fermeture en lactone catalysée par la cyclo-isomérase ou muconatase (EC 5.5.1.1) est stéréospécifique comme indiqué. Quant au 2-chloro-*cis,cis*-muconate issu de l'ouverture du 2-chlorocatéchol, la réaction est catalysée par une cyclo-isomérase distincte de la précédente (EC 5.5.1.7) **[54]**.

15 - La formule "étirée" du muconate est en principe la plus correcte, les deux fonctions anioniques ayant tendance à se repousser mutuellement. Le produit est peu stable et a tendance à s'isomériser en milieu acide. Il doit être synthétisé au laboratoire en utilisant du catéchol et la dioxygénase purifiée.

2-chloro-*cis,cis*-muconate

5-chloromuconolactone

2-chloromuconolactone

trans-diènelactone

Les lettres a et b servent à repérer les points de fermeture du cycle selon deux modes différents. Les flèches épaissies correspondent aux réactions observées à la fois chez des espèces Gram-positives et négatives, les autres chez les Gram-négatives seulement. La déchloration du 3-chloromuconate est plus simple, et s'effectue irréversiblement en une seule étape.

Le fluor occupe une place spéciale parmi les halogènes. L'atome de fluor est très électronégatif, et à peine plus gros qu'un atome d'hydrogène sur un cycle aromatique, sa liaison avec le carbone y étant très stable. Il exerce volontiers une influence comme donneur sur le cycle par suite d'un effet de résonance qui l'emporte sur le pouvoir attracteur d'électrons du fluor. Cette particularité contribue à faire la diffférence au point de vue biodégradation. La catécholase II de B13 et la dioxygénase de *Ralstonia eutropha* attaquent facilement les 3- et 4-fluorocatéchols. On pourrait donc penser que ces aromatiques fluorés sont biodégradables dans tous les cas, mais il n'en est rien. L'halogène étant confortablement installé sur le cycle, son élimination implique généralement la désaromatisation de la molécule, et ne peut se faire que dans une étape ultérieure du métabolisme. Dans le cas contraire s'accumule un intermédiaire fluoré récalcitrant qui peut éventuellement avoir des effets toxiques sur les cellules.

La présence d'un ou plusieurs atomes de fluor dans une molécule organique est un atout de poids pour l'étude de sa biodégradation grâce à la RMN du fluor-19. L'emploi de la RMN sur le plan général est souvent rendu délicat par son manque de sensibilité, en particulier en RMN du proton. Le tracé des spectres nécessite alors une forte concentration de substance à examiner, ou exige de longues périodes d'accumulation du signal pour le faire ressortir au-dessus du bruit de fond. Le fluor a l'avantage d'avoir un large déplacement chimique de l'ordre de 500 ppm, contre 250 pour le carbone-13 et seulement 15 ppm pour le proton. Les spectres obtenus avec le fluor sont plus simples, beaucoup moins entachés de bruit de fond, et permettent une bonne sensibilité pour les études de biodégradation. Il est alors possible de suivre la dégradation du produit au cours du temps, et de déceler tous les intermédiaires formés en partant d'une concentration de substrat inférieure à 1 mM, proche des conditions physiologiques acceptables.

Cette technique a été exploitée avec succès par plusieurs équipes de chercheurs. Des auteurs néerlandais et russes ont suivi ainsi la biodégradation de divers phénols fluorés par 4 espèces de *Rhodococcus* **[55]**. On sait que ces actinomycètes sont remarquables par leur polyvalence. Les germes ont tous été isolés à partir de terrains contaminés par des résidus pétroliers et pouvaient attaquer des hydrocarbures ou se développer sur phénol 1 mM. Les phénols mono-, di- et trifluorés étaient attaqués inégalement selon la position des atomes de fluor et selon les souches, par une hydroxylation, puis par scission intradiol. Ce travail a montré les excellentes perspectives offertes par la RMN du fluor-19, mais n'a pas encore permis de fixer des règles systématiques pour la dégradation des divers phénols fluorés.

Nous constatons en conclusion que la déshalogénation effectuée au cours de la voie de dégradation *ortho* est une opération cruciale du recyclage des aromatiques halogénés, mais qu'elle comporte de très nombreux cas particuliers et ne parvient pas toujours à son terme. Heureusement, les micro-organismes de la biosphère se développent en populations mixtes qui mettent en commun bon an mal an leurs compétences.

CONCLUSION

Les voies décrites dans ce chapitre sont communes dans la nature et représentent peut-être les plus primitives, réglées par des gènes appartenant le plus souvent au chromosome bactérien, assez souples pour accepter de métaboliser certains xénobiotiques comme des dérivés halogénés. L'atome d'halogène est éliminé au cours de la première étape ou plus tardivement. Le procédé intradiol reste souvent assez sélectif et ne s'applique pas à de nombreux aromatiques substitués. Il est heureusement complété par d'autres mécanismes qui seront vus dans le chapitre suivant, plus facilement acquis par transferts génétiques horizontaux, et doués d'une plasticité plus grande.

RÉFÉRENCES

[1] BAYLY RC & BARBOUR MG (1984) *In "Microbial Degradation of Microbial Compounds"*, GIBSON DT ed., Marcel Dekker, New York : 253-294.

[2] DORN E & KNACKMUSS HJ (1978) *Biochem. J.* **174** : 85-94 ;
REINEKE W, KNACKMUSS HJ (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **542** : 412-423 ;
SCHLÖMANN M, SCHMIDT E & KNACKMUSS H-J (1990) *J. Bacteriol* **172** : 5112-5118 ;
HAMMANN R & KUTZNER HJ (1998) *J. Basic Microbiol.* **38** : 207-220.

[3] HARWOOD CS & PARALES RE (1996) *Annu. Rev. Microbiol.* **50** : 553-590.

[4] ORNSTON LN (1966) *J. Biol. Chem.* **241** : 3787-3794, 3795-3799,3800-3810 ;
ORNSTON LN & STANIER RY (1966) *J. Biol. Chem.* **241** : 3776-3786.

[5] Elsemore DA & Ornston LN (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 7659-7666 ;
Elsemore DA & Ornston LN (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 5971-5978.

[6] Neidle EL, Hartnett C, Ornston LN, Bairoch A, Rekik M & Harayama S (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 5385-5395.

[7] Shanley MS, Harrison A, Parales RE, Kowalchuk G, Mitchell DJ & Ornston DL (1994) *Gene* **138** : 59-65.

[8] Canovas JL & Stanier RY (1967) *J. Biochem.* **1** : 289-300; Stanier RY & Ornston LN (1973) *Adv. Microbiol. Physiol.* **9** : 89-151.

[9] Cosper NJ, Collier LS, Clark TJ, Scott RA & Neidle EL (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 7044-7052.

[10] Kowalchuk GA, Hartnett GB, Benson A, Houghton JE, Ngai K-L & Ornston LN (1994) *Gene* **146** : 23-30.

[11] Harwood CS, Nichols NN, Kim M-K, Ditty JL & Parales RE (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 6479-6488.

[12] Parke D & Ornston LN (1976) *J. Bacteriol.* **126** : 272-281 ;
Harwood CL & Ornston LN (1988) *J. Gen. Microbiol.* **134** : 2421-2427.

[13] Stanier RY, Palleroni NJ & Doudoroff M (1966) *J. Gen. Microbiol.* **43** : 159-271.

[14] Parsek MR, McFall SM, Shinabarger DL & Chakrabarty AM (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 12393-12397 ;
Chugani SA, Parsek MR & Chakrabarty AM (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 2367-2372.

[15] Schell MA (1993) *Annu. Rev. Microbiol.* **47** : 597-626.

[16] Goethals Kvan Montagu M & Holsters M (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89** : 1646-1650.

[17] Neidle EL, Hartnett C & Ornston LN (1989) *J. Bacteriol.* **171** : 5410-5421.

[18] Fava F, Di Gioia D, Romagnoli C, Marchetti L & Mares D (1993) *Arch. Microbiol.* **160**(5) : 350-357.

[19] Knackmuss H-J & Hellwig M (1978) *Arch. Microbiol*. **117** : 1-7.

[20] Dorn E & Knackmuss HJ (1978) *Biochem. J.* **174** : 73-84 et 85-94.

[21] Spain JC & Gibson DT(1987) *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1399-1404 ;
Pieper DH, Reineke W, Engesser KH & Knackmuss HJ (1988) *Arch. Microbiol.* **150** : 95-102 ;
Van der Meer JR, Van Neerven ARW, de Vries EJ, de Vos WM & Zehnder AJB (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 6-15 ;
Van der MeerJR (1997) *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**(1-2) : 159-178.

[22] Vollmer MD, Stadler-Fritzsche K & Schlömann M (1993) *Arch. Microbiol.* **159** : 182-188;
Seibert V, Stadler-Frizsche K & Schlömann M (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 6745-6754.

[23] Don RH & Pemberton JM (1985) *J. Bacteriol.* **161** : 466-468.

[24] Chatterjee DK & Chakrabarty AM (1984) *Gene* **27** : 173-181.

[25] van der Meer JR, Frijters ACJ, Leveau JHJ, Eggen RIL, Zehnder AJB & de Vos WM (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 3700-3708.

[26] Ohlendorf DH, Lipscomb JD & Weber PC (1988) *Nature* 336 : 403-405 ;
Ohlendorf DH, Orville AM & Lipscomb JD (1994) *J. Biol. Chem.* **244** : 586-608.

[27] Vetting MW, D'Argenio DA, Ornston LN & Ohlendorf DH (2000) *Biochemistry* 39 : 7943-7955.

[28] Whittaker JW & Lipscomb JD (1984) *J. Biol. Chem.* **259** : 4487-4495.

[29] Orville AM & Lipscomb JD (1989) *J. Biol. Chem.* **264** : 8791-8801.

[30] BRODERICK JB (1999) *Essays Biochem.* **34** : 173-189.

[31] MAY SW, OLDHAM CD, MUELLER PW,PADGETTE SR & SOWELL AL (1982) *J. Biol. Chem.* **257** : 12746-12751.

[32] VETTING MW, EARHART CA & OHLENDORF DH (1994) *J. Mom. Biol.* **236** : 372-373 ; D'ARGENIO DA, VETTING MW, OHLENDORF DH & ORNSTON LN (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 6478-6487.

[33] DORN E & KNACKMUSS HJ (1978) *Biochem. J.* **174** : 85-94.

[34] SUZUKI K, T GOMI, T KAIDOH & E ITAGAKI(1991) *J. of Biochemistry* **109** : 348-353 ; SUZUKI K, GOMI T & ITAGAKI E. (1991) *J. Biochem.* (Tokyo) **109** : 791-797.

[35] CHU JP, KIRSCH EJ. (1972) *Appl. Microbiol.* **23** : 1033-1035 ; SABER DL & CRAWFORD RL.(1985) *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 1512-1518 ;
SCHENK T, MÜLLER R & LINGENS F. (1990) *J. Bacteriol.* **172** : 7272-7274 ;
TOMASI I., I. ARTAUD, Y. BERTHEAU & D. MANSUY (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 307-311 ;
XUN L, E. YOUNG LY & HÄGGBLOM MM (1991) *Curr. Opin. Biotechnol.* **2** : 429-435;
TOPP & C. S. ORSER (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 2898-2902.

[36] EDERER MM, CRAWFORD RL, HERWIG RP & ORSER CS (1997) *Mol. Ecol.* **6** : 39-49 ; COPLEY SD (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25** : 261-265.

[37] XUN L, TOPP E, ORSER CS (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 2898-2902 ; MCCARTHY DL, CLAUDE AA & COPLEY SD (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 1883-1888.

[38] HOIER H, SCHLÖMANN M, HAMMER A, GLUSKER JP, CARRELL HL, GOLDMAN JJ, STEZOWSKI JJ & HEINEMANN U (1994) *Acta Crystallogr.* **D50** : 75-84.

[39] HELIN S, KAHN PC, GUHA BL, MALLOWS DG & GOLDMAN A (195) *J. Mol. Biol.* **254** : 918-941.

[40] J.A. GERLT & P.G. GASSMAN (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114** : 5928-5934.

[41] NEIDHART DJ, KENYON GL, GERLT JA & PETSKO GA (1990) *Nature* 347, 692-694 ; GERLT JA & GASSMAN PG (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114** : 5928-5934.

[42] MAZUR P, PIEKEN WA, BUDIHAS SR, WILLIAMS SE, WONG S & KOZARICH JW (1994) *Biochemistry* **33** : 1961-1970.

[43] NGAI KL, ORNSTON N, KALLEN RG.(1983) *Biochem.* **22** : 5223-5230.

[44] CHARI RVJ, WHITMAN CP, KOZARICH JW, NGAI K-L & ORNSTON LN (1987) *J. Amer. Chem. Soc.* **109** : 5514-5519.

[45] WILLIAMS SE, WOOLRIDGE EM , RANSOM SC, LANDRO JA, BABBITTPC & KOZARICH JW (1992) *Biochemistry* **31** : 9768-9776.

[46] MAZUR P, HENZEL WJ, MATOO S & KOZARICH JW (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 1718-1728 ;
POWLOWSKI JB, INGEBRAND J & DAGLEY S (1985) *J. Bacteriol.* **163** : 1136-1141 ;
THATCHER DR & CAIN RB (1975) *Eur. J. Biochem.* **56** : 193-204.

[47] SCHLÖMANN M, FISCHER P, SCHMIDT E & KNACKMUSS HJ (1990) *J. Bacteriol.* **172** : 5119-5129.

[48] SCHLÖMANN M (1994) *Biodegradation* **5** : 301-321.

[49] SEIBERT V, STADLER-FRIZSCHE K & SCHLÖMANN M. (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 6745-6754.

[50] GAAL A & NEUJAHR HY.(1980) *Biochem. J.* **185** : 783-786.

[51] SCHMIDT E & KNACKMUSS HJ.(1980) *Biochem. J.* **192** : 339-347.

[52] JANKE D, AL-MOFARJI T, STRAUBE G, SCHUMANN P & PRAUSER H.(1988) *J. Basic Microbiol.* **28** : 509-518 ;
JANKE D, IHN W & TRESSELT D (1989) *J. Basic Microbiol.* **29** : 305-314.

[53] SPAIN JC, GIBSON DT.(1987) *Appl. Envir. Microbiol.* **54** : 1399-1404 ;
SPAIN JC, ZYLSTRA GJ, BLAKE CK, GIBSON DT. STRUIJS J & ROGERS JE. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 2648-2652 ;
HEALD SC & JENKINS RO (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **45** : 56-62.

[54] VOLLMER MD & SCHLÖMAN M (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 2938-2941.

[55] BONDAR VS, BOERSMA MG, GLOVLEV EL, VERVOORT J, VAN BERKEL WJH, FINKELSTEIN ZI, SOLYANIKOVA IP, GLOVLEVA LA & RIETJENS IMCM (1998) *Biodegradation* **9** : 475-486.

Chapitre 10
Ouverture extradiol - Voie du gentisate

L'ouverture extradiol ou *méta* des catéchols s'effectue immédiatement à côté des deux hydroxyles adjacents. Le résultat est un acide carboxylique portant à l'autre extrémité de la chaîne une fonction aldéhydique ou cétonique. La multiplicité des réactions de type extradiol rend la question un peu difficile, mais elle complète les voies données dans le chapitre précédent en autorisant avec une plus grande souplesse la dégradation d'une gamme très étendue de produits. Nous ferons connaissance avec des plasmides de dégradation, avec l'élimination de polluants classiques comme les hydrocarbures polycycliques, le biphényle et ses dérivés, différents composés azotés et les dioxines. Nous examinerons aussi une variante métabolique ou voie du gentisate.

10 – Ouverture extradiol - Voie du gentisate

L'ouverture extradiol ou *méta* des catéchols s'effectue immédiatement à côté des deux hydroxyles adjacents. Le résultat est un acide carboxylique portant à l'autre extrémité de la chaîne une fonction aldéhydique ou cétonique. La multiplicité des réactions de type extradiol rend la question un peu difficile. Il a été choisi d'en donner quelques détails, afin de faciliter la navigation dans la masse considérable de données disponibles.

10.1 - Rupture extradiol du cycle aromatique

La rupture extradiol du cycle aromatique intervient dans une grande diversité de substrats, et les dioxygénases responsables ont une gamme de spécificité généralement plus large que celle des dioxygénases *ortho*, et n'ont aucune parenté structurale avec elles. Leur chef de file est la catéchol 2,3-dioxygénase. Ces enzymes renferment du fer(II) et leurs gènes sont généralement plasmidiques. Les produits formés présentent une forte bande d'absorption dans la région 390 nm du spectre. Sur boîte gélosée contenant un substrat de croissance aromatique, les colonies bactériennes catalysant l'ouverture *méta* s'entourent d'une coloration jaune qui facilite leur repérage. Lorsque le cycle est porteur d'un substituant, la coupure la plus fréquente se fait entre lui et l'hydroxyle le plus proche.

La première figure de la page suivante montre le passage du toluène au 3-méthylcatéchol. L'oxygénation du cycle se fait en principe en *ortho* ou en *méta* par rapport au méthyle. Le luène est transformé par des voies multiples. La coupure extradiol est la réaction **4**. Des souches de *Pseudomonas* **[1]** hébergeant un plasmide ont servi de matériel d'étude.

La deuxième figure montre comment le catéchol et le 3-méthylcatéchol, produits respectivement à partir du phénol et du toluène, sont attaqués par la voie *méta* **[2]**. Les modalités de l'ouverture extradiol du cycle aromatique sont nombreuses et s'appliquent à des substrats très variés. On en donnera seulement quelques exemples représentatifs. Cette voie conduit ici au pyruvate et à l'acétaldéhyde à l'aide d'une aldolase (réaction **8** de la deuxième figure). L'acétaldéhyde est réactif et toxique pour la cellule et ne s'accumule pas, car il est rapidement réduit, ou encore oxydé en acide acétique comme suggéré ici. L'oxydation par une déshydrogénase fera intervenir le coenzyme A pour donner de l'acétyl-CoA.

toluène — *o*-crésol — *m*-crésol — 3-méthylcatéchol — 2-hydroxy-6-oxo-2,4-heptadiènoate (après ouverture *méta*)

	Enzyme	Observations
1 -	Toluène-2-mono-oxygénase, *Burkholderia cepacia* G4 (catalyse les deux hydroxylations **[3]**)	Complexe, flavoprotéine + prot. de liaison + oxygénase $\alpha_2\beta_2\gamma_2$.
2 -	Toluène-3-mono-oxygénase, *Pseudomonas pickettii*, également active sur benzène, éthylbenzène, xylènes **[4]**	Inductible par les divers substrats aromatiques
3 -	Phénol hydroxylase de large spécificité **[5]**, et enzymes incomplètement caractérisées **[6]**	Transformation commune, peut produire le 4-méthylcatéchol
4 -	3-Méthylcatéchol dioxygénase, *Ps. putida* mt-2 (TodE) **[7]**	Ouverture extradiol

Hydroxylation du toluène en 3-méthylcatéchol

catéchol — 3-méthylcatéchol — $HCOO^-$ — CO_2 — acétaldéhyde, pyruvate

1 - Catéchol 2,3-dioxygénase

2 - 2-Hydroxymuconate-semialdéhyde déshydrogénase

3 - 2-Hydroxymuconate-semialdéhyde hydrolase

4 - 4-Oxalocrotonate isomérase

5 - 4-Oxalocrotonate décarboxylase

6 - 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-diènoate hydrolase

7 - 2-Oxopenta-4-énoate hydratase

8 - 4-Hydroxy-2-oxo-valérate aldolase

Voie méta

Chez *Pseudomonas* CF600, l'aldolase et la déshydrogénase ont été trouvées étroitement associées dans une sorte de complexe qui catalyse successivement les deux réactions **[8]**. Habituellement, le regroupement de plusieurs protéines dans un même complexe est interprété comme une adaptation favorable sur le plan

physiologique, car elle est censée apporter une meilleure efficacité dans la chaîne de réactions. L'aldéhyde intermédiaire entre l'alcool et l'acide serait alors oxydé au fur et à mesure de sa formation sans quitter le complexe enzymatique, et son action délétère serait ainsi évitée. On ignore si cette solution existe dans toutes les voies *méta*.

Un autre exemple à citer est celui du protocatéchuate, un produit qui nous est familier comme substrat de la dioxygénase (Pcase) *ortho*. Ici l'ouverture du cycle est soumise à deux dioxygénases *méta*, les protocatéchuate 2,3- et 4,5-dioxygénases.

Les trois dioxygénations du protocatéchuate

La protocatéchuate 2,3-dioxygénase a été caractérisée pour la première fois chez *Bacillus macerans* **[9]**, mais l'ouverture se fait plus souvent entre 4 et 5, la dioxygénase correspondante ayant été purifiée dès 1968 à partir de *Comomonas testosteroni* **[10]**. Le produit formé est le 2-hydroxy-4-carboxymuconate semialdéhyde. Trois étapes le transforment en pyruvate par une hydrolase, une hydratase et une aldolase :

Protocatéchuate 4,5-dioxygénase

Il y a départ de formiate ($HCOO^{-}$) et scission en deux molécules de pyruvate par une aldolase [1]. Nous savons que l'assimilation de ces produits est des plus banales dans la nature.

La dioxygénation extradiol du cycle aromatique dépend le plus souvent d'un métal qui est Fe(II). Le mécanisme est très différent de celui des enzymes *ortho*. On admet que le fer lie à la fois O_2 et le substrat. L'oxygène étant rendu plus réactif par sa liaison avec le fer attaquerait directement le substrat, sans que le fer ne

1 - *Le substrat est le 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxovalérate.*

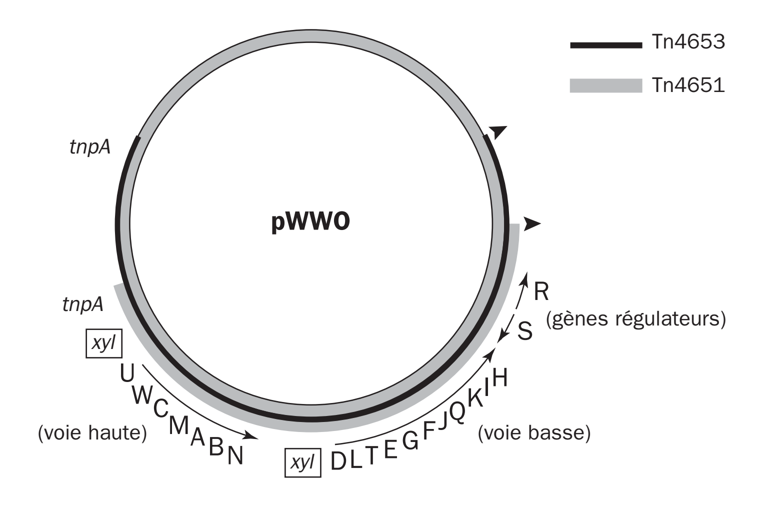
change de niveau d'oxydation au cours de la réaction. Nous aurons l'occasion d'entrevoir ce mécanisme plus en détail dans le cas de la dioxygénation du 2,3-dihydroxybiphényle à la section 5. La catéchol 2,3-dioxygénase a fait l'objet de nombreuses études. L'enzyme de *Pseudomonas* mt-2 a révélé une structure de type α_4. Chaque monomère est constitué de deux domaines homologues qui pourrait refléter une duplication ancienne du gène. L'un de ces domaines porte le Fe(II) avec une géométrie tétraédrique déformée où trois des ligands sont deux résidus d'histidine et un de glutamate [**11**]. La plupart des nombreuses enzymes de ce type déjà répertoriées semblent appartenir à une même famille où se rencontre la protocatéchuate 4,5-dioxygénase de *Pseudomonas paucimobilis* **[12]**. Il existe cependant plusieurs sous-ensembles. *Rhodococcus globerulus* possède une dioxygénase plus petite (21 kDa), qui est active sur biphényles polychlorés et n'a qu'un seul domaine **[13]**, cette question étant plus détaillée à la section 6. Le sujet se complique actuellement par l'existence des dioxygénases de type extradiol où le manganèse remplace le fer **[14]**.

10.2 - LE PLASMIDE TOL

Revenons au **toluène** et à ses homologues supérieurs directs, les xylènes. Un des modes d'attaque du toluène consiste à hydroxyler le noyau en 3-méthylcatéchol. Inversement un autre mode est de s'en prendre au méthyle sans toucher au noyau et de l'oxyder en aldéhyde puis en acide. L'intermédiaire clé obtenu est le benzoate, dont l'oxydation complète se fait par la voie *méta* en acétaldéhyde, pyruvate et deux molécules de CO_2. Tous les gènes codant pour ces opérations sont regroupés sur un même plasmide désigné par TOL.

L'archétype de plasmide TOL est le pWW0, décrit pour la première fois chez *Pseudomonas putida* mt-2 par WILLIAMS et MURRAY **[15]**. Les auteurs avaient remarqué la présence de deux oxygénases différentes actives sur le benzoate, dont une précisément avait une spécificité étendue et provenait d'un grand plasmide. Le pWW0 a 117 kb. Les gènes de dégradation du toluène en occupent environ 40 kb, soit plus du tiers **[16]**. Le toluène n'est pas le seul substrat utilisé : le *m*-xylène est également transformé en *m*-toluate, le *p*-xylène en *p*-toluate, d'où le sigle conventionnel *xyl* utilisé pour l'ensemble des gènes.

Les bactéries munies du pWW0 croissent aussi sur *m*-éthyl-toluène et sur 1,2,4-triméthylbenzène. Le dispositif génétique est assez extraordinaire parce que toute la portion plasmidique compétente est logée dans un vaste transposon de 56 kb (Tn4651), lui-même encastré dans un transposon plus grand Tn4563) **[17]**. On a isolé et décrit dans la littérature au moins une vingtaine de plasmides de structure et propriétés très voisines. Ces plasmides sont propres aux *Pseudomonas* fluorescents, mais existent plus rarement dans d'autres espèces, comme *Ralstonia eutropha* et des entérobactéries. Voici une carte simplifiée de pWW0 montrant la disposition des deux transposons emboîtés et les gènes *xyl*. Le sigle *tnpA* désigne le gène de la transposase commun aux deux transposons.



Deux séries de réactions transforment le toluène et les xylènes. La première, ou **voie haute**, est représentée par l'opéron *xylUWCMABN* et commande l'oxydation du méthyle jusqu'à au stade de l'acide, soit le benzoate à partir du toluène. La seconde, ou voie aval, correspond à *xylXYZLTEGFJQKIH*, l'opéron codant pour la totalité de la voie *méta* jusqu'aux produits terminaux (acétyl-coenzyme A et pyruvate à partir du benzoate) **[18]**.

La voie haute, qui transforme le toluène en benzoate, ou les xylènes en toluates, correspond à ceci :

CH_3 → *xyl***MA** → CH_2OH → *xyl***B** → CHO → *xyl***C** → COO^- (R, R')

toluène	*p*-xylène	*m*-xylène
R = H	R = CH_3	R = H
R' = H	R' = H	R' = CH_3

La voie haute

Il est facile de voir que *xylMA* code pour une mono-oxygénase, alors que *xylB* et *xylC* déterminent deux déshydrogénases successives. Que font les autres gènes : *xylU*, *xylW* et *xylN* ? La fonction des deux premiers reste obscure. En effet leur altération par mutation n'a aucun effet sur le métabolisme du toluène et des autres substrats. La protéine XylW pourrait être une déshydrogénase active sur un substrat non identifié **[19]**. On connaît par contre la fonction de *xylN*. Ce gène coderait pour une porine utilisée dans le passage du xylène à travers la membrane externe **[20]**.

Au début n'avaient été reconnus dans la voie haute que les gènes A, B et C, mais on découvrit rapidement que la structure génétique de cet ensemble était plus compliquée. L'oxygénase avait deux sous-unités (d'où le gène M supplémentaire) et d'autres gènes furent trouvés. L'opéron est en fait *xylUWCMABN !* XylU et XylW ne

sont pas nécessaires à la dégradation du toluène et dérivés. Leur fonction doit s'exercer ailleurs dans le métabolisme. XylW rappelle par sa séquence une déshydrogénase contenant du zinc. La voie aval est de type *méta* comme entrevu antérieurement.

8 étapes pour le métabolisme du benzoate et du *p*-toluate,
6 étapes pour celui du *m*-toluate

Gène	Enzyme	Gène	Enzyme
XYZ	Xylène dioxygénase	**I**	4-Oxocrotonate décarboxylase
L	Diène-carboxylate déshydrogénase [2]	**J**	Hydratase [3]
T	Ferrédoxine	**K**	4-Hydroxy-2-oxovalérate aldolase
E	Catéchol 2,3-dioxygénase	**Q**	Acétaldéhyde déshydrogénase
G	4-OH-muconic semialdéhyde déshydrog.	**F**	4-OH-muconic semialdéhyde hydrolase
H	4-Oxocrotonate tautomérase		

La voie aval

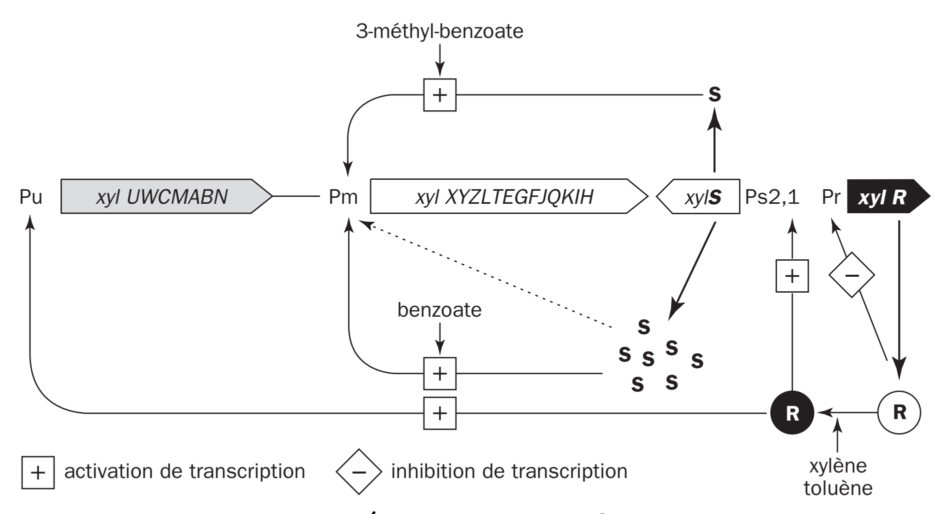
La dioxygénase XylXYZ (désignée antérieurement par XylD) n'a que deux composants, où XylZ est une partie réductase, et XylXY la partie dioxygénase **[21]**. La dioxygénase XylE est instable en présence d'oxygène, mais reste réactivable par la protéine XylT, une ferrédoxine [2Fe-2S] faite en faible abondance et dont le type se retrouve dans d'autres opérons codant pour une voie *méta* **[22]**. Cette protéine serait le membre d'une famille de ferrédoxines détectées dans d'autres systèmes de biodégradation, notamment pour le naphtalène et les crésols **[23]**. Une petite

2 - 1,2-dihydrocyclohexa-3,5-diène-carboxylate déshydrogénase.

3 - 2-Hydroxypent-2,4-diènoate hydratase.

dérivation s'observe au niveau de XylF dans la dégradation du *m*-toluate provenant du *m*-xylène. Deux chemins divergent avant de converger à nouveau. L'hydrolase XylF a été purifiée et soumise à un examen détaillé par DUGGLEBY et coll. **[24]**. Cet ensemble génétique a été la cible d'une somme considérable de recherches, car il fallait comprendre comment l'expression des deux opérons était régulée en fonction du substrat de départ. Les pièces essentielles sont les deux gènes régulateurs, ***xylR*** et ***xylS***. Ils sont présents dans tous les plasmides de la même famille. Ils occupent, comme dans pWWO, une position caractéristique et sont transcrits de façon divergente par rapport aux opérons qu'ils gouvernent. Leur contribution est essentielle à l'expression coordonnée des deux opérons. Il y a quatre modes d'asservissement. Le premier est commandé par XylR et règle la production de XylS. Le second est le réglage par XylR de sa propre production. Le troisième est le contrôle de la voie *méta* par XylS. Enfin le dernier est l'action de XylR sur l'expression de la voie haute.

Le schéma est adapté de RAMOS et coll **[25]**. On distingue les quatre unités de transcription, commandées chacune par un promoteur : la voie haute par Pu, la voie *méta* par Pm, *xylS* par Ps1 et Ps2 (promoteur double), *xylR* par Pr. C'est au niveau de ces promoteurs que la transcription des gènes situés en leur aval est facilitée ou inhibée.

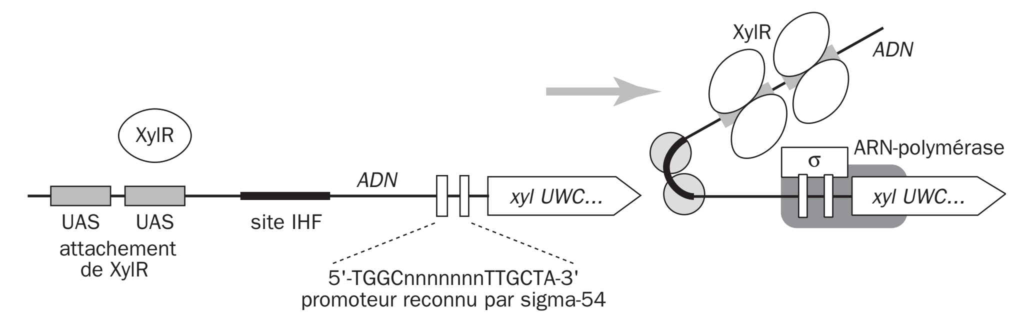


Régulations de pWWO

Le régulateur **XylR** entrave la transcription de son propre gène. Ce dispositif est classique et permet de maintenir la protéine régulatrice à un taux faible et constant. XylR intervient au niveau de la région Pr (constituée de deux promoteurs en tandem, Pr1 et Pr2). En présence d'un inducteur, XylR subit un changement de conformation qui modifie ses propriétés et le détourne en partie vers les autres promoteurs Pu et Ps1, lesquels sont activés. La liste des inducteurs possibles comprend des substrats comme le xylène, le toluène, divers produits comme l'alcool benzylique, le *p*-chlorobenzaldéhyde et le *m*-amino-toluène. XylR est donc le premier robinet qui ouvre le fonctionnement de la voie haute tout en commandant la synthèse du deuxième régulateur, XylS.

En présence d'un inducteur, la protéine XylR donne le feu vert à la transcription, par interaction avec l'ARN-polymérase au niveau d'un promoteur. La polymérase s'y installe normalement grâce à un facteur d'amorçage appelé facteur sigma. Il y a plusieurs types de promoteurs correspondant chacun à un facteur sigma déterminé. Ici Pu et Ps1 sont des promoteurs d'un type spécial. Ils sont reconnus par le facteur **sigma-54** (appelé aussi NtrA ou RpoN), spécialisé dans la reconnaissance de ces promoteurs. C'est là qu'intervient une situation paradoxale mais classique. XylR devrait se lier à l'ADN très près du promoteur, pour venir en contact avec la polymérase. En fait il se lie un peu plus loin en amont. Pour que l'amorçage de la transcription soit réalisé, un complexe ternaire polymérase/sigma-54/XylR doit se former. Cette condition est réalisée par une flexion de l'ADN. Elle est facilitée par un quatrième facteur capable d'y former un coude : la protéine *IHF** dans le cas de Pu, HU pour Ps1. Le mécanisme est donc similaire à celui qui est mis en jeu dans la dénitrification.

Le dessin suivant est une représentation naïve de cette situation. L'activateur XylR reconnaît sur l'ADN une ou plusieurs séquences spécifiques, les **UAS**. L'installation est multiple et coopérative [4]. Elle est déclenchée par un inducteur. En se liant au toluène, XylR acquiert de nouvelles propriétés, s'attache à l'ADN sur les UAS et fixe aussi de l'ATP.



La courbure de l'ADN facilite le rapprochement de l'activateur XylR avec la polymérase

Résumons simplement les différentes étapes :

- Le sigma reconnaît le promoteur et le tandem polymérase + sigma attend au feu rouge.
- En liant un inducteur, XylR a une affinité accrue pour l'ADN sur les sites UAS.
- Le facteur IHF s'accroche aussi à l'ADN et le déforme, mettant XylR en contact avec la polymérase.
- L'association générale ainsi formée remet le feu au vert : la transcription de l'opéron peut commencer et déclencher une cascade d'événements. En effet, la voie haute ainsi induite par le toluène, le xylène et leurs analogues, libère du benzoate ou des dérivés benzoïques, et ces derniers vont déclencher à leur tour le lancement de la voie *méta* par le promoteur Pm.

---

4 - L'installation d'une première unité facilite celle d'une deuxième, et ainsi de suite. La coopérativité de l'association sur l'ADN permet le passage brusque d'un état où il n'y a rien à l'état où tout est lié.

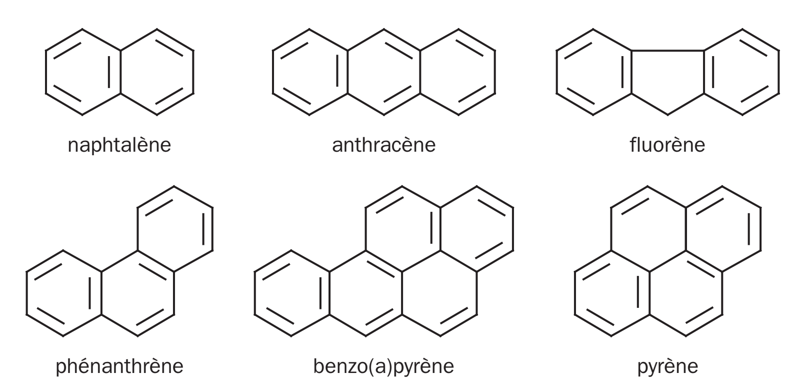
Que fait la protéine **XylS** ? Son fonctionnement comme activateur ressemble à celui de XylR. Elle est produite continuellement à partir du promoteur Ps2, mais sa sortie est accélérée par XylR sur Ps1 comme indiqué sur le schéma. Là encore se trouvent des UAS reconnues par XylR. Le coude dans l'ADN n'est pas fait par IHF mais par HU sur le même principe. XylS seule active faiblement en continu la voie *méta* et entretient un petit niveau de base des enzymes de la voie aval avant que leur synthèse soit fortement augmentée quand XylS lie du benzoate. Or celui-ci est engendré par la voie haute. Ce système d'activation générale en deux temps vise à l'économie. Il n'autorise la sortie des enzymes *méta* en présence de toluène que si la voie haute a fonctionné, c'est-à-dire si le benzoate a déjà fait son apparition.

Que se passe-t-il si le milieu est dépourvu de toluène mais contient du benzoate ? La machine pourrait se bloquer dans la mesure où la production de XylS est réglée par XylR, qui a besoin du toluène pour jouer pleinement son rôle. La nature a tout prévu. Nous savons que XylS est formé en continu au ralenti, et la voie *méta* peut tout de même fonctionner. La présence de 3-méthylbenzoate peut aussi déclencher l'activation. Nous avons vu que ce composé est transformé par une voie *méta* modifiée faisant appel à l'enzyme XylF. Celle-ci est produite en même temps que les autres. Des réglages plus compliqués semblent intervenir. Le promoteur Pm placé à l'origine de l'opéron *méta*, n'est pas reconnu par sigma-54, mais par sigma-70, le facteur d'amorçage de transcription le plus banal dans la machinerie cellulaire. L'activateur XylS se lie dans la même région un peu en amont, avec un recouvrement partiel des zones d'attachement : il y a peut-être une compétition entre XylS et le sigma-70 selon un équilibre qui serait déplacé dans un sens ou dans l'autre selon qu'il y a du benzoate ou non.

Une vaste littérature a été consacrée à ces réglages, car le plasmide pWW0 et les autres plasmides TOL ont un côté exemplaire. Une bactérie peut acquérir un ensemble génétique sophistiqué et accéder ainsi au métabolisme de composés exotiques dont l'utilisation est régulée. L'origine des plasmides TOL est encore énigmatique. Plus d'une dizaine de plasmides pWW ont été répertoriés et montrent de grandes analogies avec pWW0. Ils ont tous la même organisation en deux opérons, voie haute et voie aval, avec la même disposition des gènes dans chacun d'eux. Seuls varient l'ordre des opérons l'un par rapport à l'autre, leur orientation et leur distance. On peut y rencontrer des duplications créant une deuxième copie de chaque opéron. Celle-ci peut être est complète ou partielle **[26]**. Pourtant les plasmides isolés dans différentes parties du monde conservent de fortes ressemblances. Les voies métaboliques ont sans doute été assemblées de longue date sous forme de plusieurs unités génétiques qui ont été transmises et associées par conjugaison, transposition et recombinaison, puis rigoureusement sélectionnées. Certains gènes ont des ressemblances marquées avec ceux de la voie du naphtalène que nous trouverons dans la section suivante. On a tout lieu de croire que l'organisation des plasmides TOL est le modèle d'une situation répandue dans la nature, par laquelle des orgnismes ont acquis d'un seul coup la possibilité de dégrader des substrats nouveaux.

10.3 - NAPHTALÈNE ET SALICYLATE

Le naphtalène est le plus simple des hydrocarbures aromatiques polycycliques ou **HAP** (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, ou PAH) dont il existe une grande diversité dans le pétrole brut. L'environnement en contient en faible quantité mais on en connaît mal l'origine. Des hydrocarbures de cette catégorie apparaissent par pyrolyse au cours des feux de forêt ou par combution des produits pétroliers. Les HAP ne devraient présenter par eux-mêmes qu'un risque très faible pour la santé, mais leur transformation en produits cancérigènes par le foie en fait des polluants relativement dangereux. Le cas du benzo(a)pyrène est à cet égard bien documenté. Le naphtalène et les HAP à faible masse moléculaire sont volatils, facilement adsorbés par les éléments du sol, et soumis à biodégradation par les bactéries et les champignons. Les composés suivants ont été détectés dans l'environnement et reconnus comme biodégradables :



La dégradation la mieux connue est celle du naphtalène, dont la transformation en salicylate est spécifiée par les plasmides NAH. Les plasmides SAL ont les gènes pour hydroxyler le salicylate en catéchol et le minéraliser entièrement par la voie *méta*. Certains plasmides NAH ont aussi les gènes de la voie *méta* et peuvent dégrader complètement le naphtalène. Il est donc de coutume d'appeler "voie haute" la transformation du naphtalène en salicylate et "voie basse" la suite des opérations **[27]**.

Le plasmide **NAH7** de *Pseudomonas putida* est le plus étudié. Les gènes sont groupés en deux opérons, *nahABCDEF* (voie haute) et *nahGTHIJKL* (voie aval). Le gène régulateur *nahR* contrôle positivement l'expression des deux opérons. La filiation évolutive de ces différents plasmides est mal connue. NAH7 et SAL1 sont presque identiques, mais le second ne permet l'utilisation que du salicylate. Il contient pourtant l'opéron de la voie haute, mais l'expression de celui-ci est bloqué par l'insertion d'un élément IS **[28]**. Les différents plasmides de ces catégories semblent tous apparentés entre eux.

La coupure *méta* catalysée par la dioxygénase à l'étape C est assez particulière. Le cycle formé est le résultat d'une cyclisation spontanée du produit formé **[29]**. La transformation du naphtalène en salicylate est codée par l'opéron *nahABFCED*.

A Naphtalène dioxygénase
B Naphtalène-*cis*-dihydrodiol déshydrogénase
C 1,2-Dihydroxynaphtalène dioxygénase
D 2-Hydroxycromène-2-carboxylate isomérase
E 2-Hydroxybenzaldéhyde aldolase
F Salicylaldéhyde déshydrogénase

Voie haute

Dans les étapes **A** et **B**, nous retrouvons le mécanisme de dioxygénation du benzène. La réaction **A** correspond à la naphtalène dioxygénase. À peu près partout où cette enzyme a été étudiée se retrouve la même organisation de base à trois composants. La partie hydroxylase proprement dite est un hexamère $\alpha_3\beta_3$ contenant trois sous-unités fer-soufre α de type RIESKE et trois petites sous-unités associées β par lesquelles transitent les électrons. Les deux autres protéines partenaires sont une réductase flavinique et une ferrédoxine. La source d'électrons est NADH. Le locus génétique *nahA* est donc composite : *nahA***a** (une partie de la réductase), *nahA***b** (la ferrédoxine), *nahA***c** (la partie fer-soufre) et *nahA***d**.

L'étape **C** est une ouverture du cycle en *méta* selon un mécanisme moins évident que dans les cas déjà rencontrés. Elle produit en effet un intermédiaire instable qui se cyclise à nouveau. Il y a donc deux oxygénations dans le parcours **A-C**. La première utilise en **A** une source d'électrons (NADH). La seconde en **C** est une dioxygénase *méta* n'utilisant pas de source réductrice. L'opéron *nahGTHINLKJ* de la voie aval (ou opéron SAL) intervient ensuite :

Là encore opèrent deux oxygénations, en G et H, dont la première, catalysée par la salicylate hydroxylase, utilise NADH comme source réductrice. Cette enzyme est une flavoprotéine à FAD, dont le cycle catalytique fonctionne comme celui de la 4-hydroxybenzoate hydroxylase [5]. Les deux opérons sont orientés dans le même sens sur le plasmide NAH7, portés comme dans le cas de pWW0 par un vaste transposon (Tn4655) **[30]**. L'ensemble du dispositif, induit par le naphtalène, coexiste avec une voie *ortho*, codée par des gènes chromosomiques et induite par le benzoate ou le salicylate **[31]**.Entre les deux opérons de NAH7 et orienté comme d'habitude en sens inverse, se trouve le gène régulateur *nahR*.

5 - *Fixation du substrat en premier, réduction du complexe formé, fixation de l'oxygène diatomique, libération du (des) produit(s). Voir la description du cycle au Chapitre 8.*

salicylate
catéchol
(voie *ortho*)
pyruvate acétaldéhyde

G Salicylate hydroxylase
T Ferrédoxine du même type que XylT **[32]**
H Catéchol 2,3-dioxygénase
I 2-Hydroxymuconate semialdéhyde déshydrogénase
J 2-Hydroxymuconate tautomérase
K Oxalocrotonate décarboxylase
L 2-Oxopent-4-énoate hydratase
M 2-Oxo-4-hydroxypentanoate aldolase

Voie basse

De profondes ressemblances d'organisation et de séquences entre les opérons du naphtalène sur NAH7 et ceux du toluène sur TOL ont été remarquées par plusieurs auteurs, pouvant indiquer une relation évolutive entre les deux systèmes de dégradation **[33]**. La capacité de dégrader le toluène semble extrêmement commune dans la nature, et au cours d'une recherche systématique plus de 100 souches ont été isolées à partir de sédiments marins ou de terrains pollués, toutes capables de croître sur naphtalène comme seule source de C. Elles étaient pour la plupart des *Pseudomonas*. Aucune de ces souches n'avait la catéchol 1,2-dioxygénase caractéristique de la voie *ortho*, mais toutes ouvraient le noyau aromatique en *méta* par une catéchol 2,3-dioxygénase **[34]**. L'impression qui prévaut généralement est qu'un certain nombre de gènes représentant des modèles catalytiques anciens ont été remaniés, juxtaposés, souvent par groupes entiers, pour se retrouver dans des plasmides transmissibles. Ces derniers ont permis l'adaptation rapide des cellules qui les hébergeaient. Les regroupements ont pu se constituer au hasard. En gardant à l'esprit qu'ils se sont effectués dans des populations composées de milliards et de milliards de cellules, celles qui se sont trouvées avoir tiré le bon numéro ont été vigoureusement sélectionnées. Elles ont été à l'origine des souches nouvelles dont les techniques d'isolement des laboratoires ont révélé l'existence.

La méthodologie employée par les bactéries porteuses d'un plasmide NAH pour oxyder le naphtalène n'est pas seule à être mise en pratique dans la nature. Les **eucaryotes**, des champignons aux mammifères, opèrent différemment.

Un **naphtol** (le 1-naphtol ou α-naphtol prédomine) ou une naphtoquinone sont formés comme intermédiaires, selon une procédure observée à l'origine chez un champignon filamenteux, *Cunninghamella elegans* **[35]**. Une mono-oxygénation forme un époxyde qui se ré-aromatise en naphtol ou s'hydrate en diol **[36]**. Le détail à remarquer sur la gauche de la figure est la nature du diol formé. Dans un métabolisme bactérien, le cycle aromatique serait oxygéné en un *cis*-diol. Le produit obtenu ici est le *trans*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphtalène, en bref un diol *trans*.

naphtalène **époxyde** 2-naphtol

trans–diol 1-naphtol

1,2-naphtoquinone 1,2-dihydroxynaphtalène 1,4-naphtoquinone 4-hydroxy-1-tétralone

Le mode eucaryote

Un mécanisme complètement différent est à l'origine de cet isomère. La formation de l'époxyde intermédiaire est le fait d'une mono-oxygénase identifiée comme un **cytochrome P450** peu spécifique, agissant non seulement sur les naphtalènes mais sur d'autres hydrocarbures polycycliques. La même stratégie est utilisée par les enzymes P450 du foie des mammifères. Les P450 forment une vaste famille d'oxygénases aux nombreuses potentialités, agissant souvent comme des hydroxylases. Plus d'une centaine de séquences sont connues. L'action d'un P450 porte typiquement sur des substrats à caractère hydrophobe. Il est intéressant de voir que ce modèle d'attaque a été largement privilégié chez les eucaryotes, plutôt que le schéma standard des dioxygénases bactériennes actives sur le cycle aromatique.

10.4 - Les polycycliques

La famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) commence par le naphtalène, et peut comporter un nombre plus ou moins élevé de cycles. Ce sont des constituants naturels du pétrole brut. Leur libération dans l'environnement se fait par des voies multiples : combustion incomplète des carburants, pollution par des activités de raffinage, abrasion de l'asphalte des routes. Il y en a dans la fumée de tabac. Ils contaminent facilement les plantes et les aliments. Le danger vient surtout de leur caractère cancérigène à partir de 4 ou 5 cycles dans la molécule. Ce sont donc les membres comportant plus de trois cycles dont la pollution est la plus préoccupante **[37]** lors des marées noires (Erika) ou après épandage du **créosote** utilisé pour la conservation du bois. La législation restreint maintenant son emploi.

Les polycycliques sont traités par les bactéries et les champignons sur le même principe que le naphtalène. Ces hydrocarbures sont rendus peu mobilisables à cause de leur caractère hydrophobe. Ils ont un coefficient KOC élevé. Leur attaque est d'autant plus lente qu'il y a davantage de cycles dans la formule. L'oxygénation peut s'exercer à plusieurs endroits de la molécule et conduire à un mélange de produits dont certains sont excrétés dans le milieu extracellulaire. La vie moyenne de ces composés dans les sols contaminés peut atteindre des mois, voire des années. Comme la dégradation est souvent incomplète et se fait le plus souvent par cométabolisme, elle peut conduire à l'accumulation de composés oxygénés récalcitrants. Pourtant une croissance bactérienne utilisant un poly-aromatique comme seule source de carbone et d'énergie reste possible. Des travaux remontant à plus d'une dizaine d'années en ont fait la démonstration en cultivant un *Pseudomonas paucimobilis* sur fluoranthène **[38]**. Une série d'autres composés tels que naphtalène, fluorène, anthracène et divers dérivés étaient également métabolisés. Des observations récentes ont révélé que diverses espèces appartenant au genre *Sphingomonas* ont une aptitude particulière à dégrader les polycycliques **[39]**. Les techniques utilisées dans ces études ont recours à la mesure du CO_2 radioactif libéré à partir de substrats marqués, à des changements d'absorption dans l'ultraviolet, et à l'identification des intermédiaires par spectrométrie de masse. Les croissances obtenues sont parfois très lentes, avec un temps de génération de l'ordre de 12 à 35 h à 30°C et à pH neutre.

La biodégradation des polycycliques par les bactéries débute presque toujours de la même façon. L'un des cycles est doublement hydroxylé avant d'être généralement ouvert en *méta*, puis entièrement détruit avant que démarre l'oxydation d'un autre cycle. Voici un schéma pour donner une idée de la dégradation du **fluoranthène** par *Pseudomonas*, *Alcaligenes denitrificans* et *Mycobacterium* **[40]** :

fluoranthène

Dégradation du fluoranthène

La dégradation du pyrène, de l'anthracène et du **benzo(a)pyrène** (BaP) a retenu beaucoup d'attention. Les intermédiaires de l'attaque du BaP par un *Mycobacterium* ont été identifiés par SCHNEIDER et coll. Le substrat s'effectue par cométabolisme dans un milieu organique complexe. Un premier cycle est ouvert par dioxygénation qui est, selon les cas, de type *méta* ou *ortho*.

10
9
8
7
6
5
4
benzo(a)pyrène

COO⁻
COO⁻
cis-4,5-BaP-dihydrodiol

⁻OOC
O
OH
cis-9,10-BaP-dihydrodiol

⁻OOC
O
HO
cis-7,8-BaP-dihydrodiol

⁻OOC
7,8-dihydropyrène-7-carboxylate

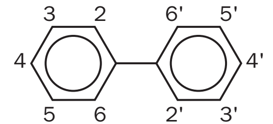
⁻OOC
7,8-dihydropyrène-8-carboxylate

Attaque du BaP par Mycobacterium

Ces schémas sont présentés à titre indicatif et montrent des variantes selon les espèces **[41]**. On tire de tout cela l'impression que les polycycliques sont effectivement biodégradables, au moins dans une certaine mesure et le plus souvent par cométabolisme. En cas de pollution des eaux et des sols, la disparition de ces produits reste lente, et souvent problématique. On peut l'accélérer par addition d'agents mouillants dont la fonction est de disperser et de solubiliser le polluant. Il est fait également recours à l'épandage de bactéries compétentes. Dans le cas des grosses pollutions comme les marées noires de l'Erika et du Prestige, le traitement biologique des hydrocarbures présents dans les produits lourds déversés ne semblait pas praticable dans un délai raisonnable. Restaient la pelle, la brouette et l'huile de coude, et dans cette situation malheureuse, c'est ce qu'il a fallu faire en priorité !

10.5 - BIPHÉNYLE ET PCB

Après les poly-aromatiques, nous voici sur de nouvelles douceurs polluantes ! Le **biphényle**, renfermant deux cycles benzéniques reliés par une liaison carbone-carbone, et les **PCB,** ou polychloro-biphényles, sont substitués par 1 à 10 atomes de chlore.



Biphényle

Tous ces produits sont artificiels, mais leur première synthèse remonte à plus de cent ans. Ils se sont répandus sur le marché grâce à leur stabilité, leur résistance aux acides et bases, leur bonne conductibilité thermique. On les rencontre aussi dans les encres, les pesticides. Leurs applications sont variées.

La popularité industrielle des PCB est aidée par la simplicité de leur synthèse, obtenue par passage de chlore gazeux sur le biphényle à 150°C avec du chlorure ferrique comme catalyseur. Le résultat est un mélange très hétérogène de produits plus ou moins chlorés appelés des **congénères** [6]. Les diverses préparations commercialisées ont reçu des noms différents en fonction du fabricant : Aroclor (Monsanto), Kaneclor (Kanefugli), Clophen (Bayer), Pyralène (Rhône-Poulenc) [7], Fenclor (Caffaro). Les composés ne contenant qu'un seul atome de chlore, comme dans l'Aroclor 1221, ont une certaine solubilité dans l'eau, de l'ordre de 1,5 mg/L. La solubilité diminue avec l'augmentation du nombre de chlores. Par exemple l'Aroclor 1242 et le Pyralène 3000 ont en moyenne 3 atomes de chlore par molécule [8], et leur solubilité est inférieure à 0,5 mg/L. Elle devient très faible à partir de 5-6 Cl.

Les PCB sont devenus un sujet de préoccupation né de leur accumulation dans l'environnement, de leur rémanence (en particulier celle des congénères les plus chlorés), et de leur toxicité [9]. Aussi la production et la vente des PCB ont-elles été bannies dans de nombreux pays. En outre le danger des pyralènes a été souligné en France à la suite d'incendies mettant en cause des transformateurs, car ils ont été considérés comme sources potentielles de dioxines. Les risques réels sont cependant controversés. De gros efforts sont encore déployés pour venir à bout des PCB contaminants du sol, où ils restent fortement adsorbés sur la matière organique.

---

6 - *Et non pas des isomères, puisque les constituants du mélange n'ont pas la même formule brute.*

7 - *Les pyralènes contenant 4 à 5 atomes de chlore par molécule ont été utilisés comme excellents diélectriques dans les transformateurs de forte puissance.*

8 - *La nomenclature des Aroclor traduit la composition. Les deux premiers chiffres donnent le nombre d'atomes de C (12 dans les PCB), les deux autres donnent le pourcentage de Cl en poids, soit 42% pour l'Aroclor 1242, qui a en moyenne 3,2 Cl par molécule.*

9 - *Les PCB peuvent s'accumuler en petites quantités dans l'organisme humain, y engendrer des effets toxiques dont des migraines, douleurs articulaires, hypertension.*

La biodégradation des PCB est à la fois aérobie ou anaérobie. Il est assez facile d'obtenir des souches bactériennes aérobies cultivables sur biphényle comme seule source de carbone et d'énergie **[42]**. Parmi ces germes : *Comomonas testosteroni*, *Pseudomonas cepacia*, *Ps. putida*, *Ralstonia eutropha*, divers *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*. Des espèces bactériennes Gram-positives, comme *Nocardia*, *Arthrobacter* ou *Rhodococcus* ont des potentialités nombreuses **[43]**. Toutes ces espèces sont communes dans les sols. Nous laisserons de côté l'attaque des PCB à l'abri de l'air, observée dans les sédiments où s'établit une déchloration réductrice. Voici quelques principes généraux de la biodégradation aérobie :

- Les PCB contenant un ou deux atomes de chlore sont éventuellement supports de croissance en présence de dioxygène. Les congénères contenant davantage de chlore sont généralement attaqués par cométabolisme **[44]**.
- Les PCB sont d'autant moins biodégradables que la molécule contient davantage de chlore. Les congénères porteurs de plus de 5 Cl tendent à être récalcitrants à toute attaque biologique.
- Les congénères porteurs de deux atomes de chlore en *ortho* (2,2') tendent à être récalcitrants, mais sont attaqués par *Pseudomonas* LB400. Il y a des différences marquées entre souches.
- Les PCB porteurs de chlore sur les deux cycles sont moins facilement biodégradables que ceux qui ont un cycle non chloré.
- L'attaque commence par dioxygénation sur le cycle non chloré ou le moins chloré. L'existence de deux positions adjacentes libres en *ortho* et *méta* facilite cette dioxygénation.

La minéralisation du biphényle non halogéné débute comme l'indique le schéma.

Substrat de croissance

Les lettres **A**, **B**, **C** et **D** désignent les quatre étapes codées par les opérons plasmidiques *bphABCD* présents dans plusieurs espèces, notamment chez un *Pseudomonas putida* [**45**]. La double hydroxylation d'un noyau par dioxygénase et déshydrogénase obéit au schéma classique déjà rencontré (benzène, toluène : ici étapes **A** et **B**). L'étape notée **A** est commandée par les gènes *bphA*. Elle est catalysée par un complexe de trois protéines du type habituel associant BphAE, qui est la dioxygénase proprement dite avec ses deux sous-unités A et E,

la réductase BphG (fonctionnant avec NADH) et la ferrédoxine BphF **[46]**. L'étape **A** utilise donc plusieurs gènes *A*, *E*, *F* et *G* comme il est indiqué [10].

L'étape **B** est celle d'une déshydrogénase. En **C**, une deuxième dioxygénase, codée par *bphC*, ouvre le cycle en *méta*, avant la double hydratation en benzoate et 2-oxo-4-hydroxypentanoate (**OHP**). Le métabolisme ultérieur de benzoate se fait par une voie similaire à celle de la "voie aval" du plasmide TOL. En observant avec attention celle-ci, on découvre qu'une deuxième molécule d'OHP est formée à partir du biphényl. L'OHP est ensuite scindé en acétaldéhyde et pyruvate par une aldolase, et récupéré ainsi par le métabolisme intermédiaire.

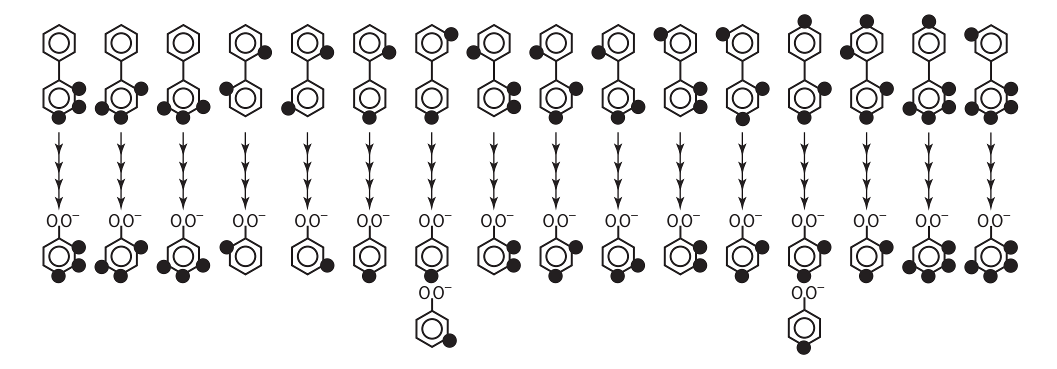
Métabolisme du benzoate

La situation se complique dans le cas des PCB puisque la présence d'atomes de chlore peut bloquer la dioxygénation ou accompagner l'apparition d'un chlorobenzoate difficile à métaboliser. Le chlore, lorsqu'il est éliminé, l'est toujours sous forme d'ion **chlorure**. Voici comment une souche croissant sur biphényle comme seule source de carbone et d'énergie entame le 4,4'-dichlorobiphényl par co-métabolisme **[47]**.

Substrat cométabolisé

10 - Ces détails sont explicités ici, au risque d'être indigestes, parce que selon les auteurs le terme "dioxygénase" s'applique à l'ensemble du complexe qui transforme le substrat en un cis-diol, alors qu'ailleurs ce même terme est associé à la partie BphAE (une grosse sous-unité, une petite) ou ISP, qui est le vrai catalyseur de l'opération comme dans la double hydroxylation du benzène et du toluène. Les facteurs BphE et BphG sont des protéines accessoires acheminant les électrons de la source NADH vers ISP. Donc dans le premier cas BphA désigne en bloc tout le complexe, tandis que dans l'autre il ne désigne que l'une des parties de l'ISP. Pour corser la situation, les sites A, E, F et G sont aussi appelés A1, A2, A3 et A4. D'où quelquefois des confusions d'un article à l'autre.

Le premier noyau attaqué est entièrement détruit après hydroxylation, ouverture préférentielle en *méta* (extradiol) et transformation en un chlorobenzoate. Le principe est donc le même que celui qui s'applique au biphényle non chloré. Les différentes enzymes déterminées par *bphA*, *bphB* et *bphC* sont également actives sur les PCB quand le cycle a des positions 2 et 3 non halogénées. Néanmoins l'élimination du chlore par hydroxylation à ce niveau reste possible si la spécificité de la dioxygénase le permet. Cette situation a été examinée en détail chez *Burkholderia* LB400 **[48]**. Le tableau montre une série de congénères contenant 2 à 5 atomes de chlore, signalés par les points noirs. La ligne du bas représente les benzoates chlorés obtenus après les 4 réactions **A**, **B**, **C** et **D** [11]. Ce sont les produits qui posent problème bien souvent, lorsque leur transformation ultérieure est bloquée par la présence de l'halogène.



On vérifie sur ces exemples le principe qui veut qu'un des deux cycles soit entièrement détruit avant le second. La première réaction est celle de BphA, la **biphényle-2,3-dioxygénase**. Il existe une certaine variabilité en fonction des souches, mais la double hydroxylation est tout de même possible en 2 et 3 du cycle lorsqu'un atome de chlore est présent dans cette partie, surtout s'il est placé en 2 (*ortho*). La coupure ultérieure du cycle est généralement de type *méta*, soit entre les carbones 1 et 2 comme indiqué précédemment.

Le substrat de départ ne peut pas assurer la croissance si les intermédiaires chlorés ne sont pas transformés jusqu'au bout. Il s'agit alors d'une impasse et un cométabolisme avec un substrat de croissance est nécessaire. Cette situation n'est pas générale. Un *Acinetobacter* peut transformer le 4-chlorobenzoate par déchloration et transformation en protocatéchuate. Celui-ci est à son tour métabolisé à la fois par les voies *ortho* et *méta* **[49]**. En effectuant une culture mixte où ces bactéries sont mélangées avec une souche attaquant le chlorobiphényle, la minéralisation complète du substrat de départ devient possible **[50]**. Là encore, les biodégradations les plus performantes sont réalisées par un mélange de souches,

11 - *Cette étude a été réalisée avec des congénères purifiés, non pas avec un mélange de type Aroclor. Il s'agit d'examiner la conversion de chaque substrat individuel, en utilisant la chromatographie et la spectrométrie de masse. Ce type de recherche a donc un côté coûteux et laborieux, mais c'est la seule façon d'y voir clair dans l'influence de la position et le nombre des atomes de chlore dans la molécule sur la transformation obtenue.*

la situation normale dans la nature. L'élimination des PCB se fait rarement à l'aide d'une seule espèce de micro-organisme, et une dégradation anaérobie peut venir en renfort de l'attaque faite en présence d'oxygène de l'air.

Il existe pourtant une alternative à la réalisation de cultures mixtes. Des croisements génétiques entre deux souches de compétences différentes engendre des bactéries dont les potentialités sont étendues. Ces nouvelles souches dites "construites" sont alors capables d'attaquer une gamme plus vaste de congénères **[51]**. Une des principales difficultés s'opposant à la minéralisation complète des PCB vient de la multiplicité des congénères en mélange et l'apparition de sous-produits chlorés, notamment des chloro-catéchols, qui ont des effets toxiques lorsqu'ils ne sont pas immédiatement détruits. Un blocage peut se produire si la dégradation engendre un chlorobenzoate, lequel n'est pas dégradé plus avant. La souche BN10 de *Pseudomonas putida* offre cette situation. Elle est capable de se développer sur biphényle (non chloré) comme substrat de croissance **[52]**. L'Aroclor 1221 n'a qu'un seul atome de chlore par molécule en moyenne, et la souche ne le dégrade que partiellement en attaquant le cycle non halogéné avant de libérer dans le milieu le composant résiduel.

minéralisation complète

produits accumulés :

Biphényl et Aroclor 1221

Pseudomonas B13 est capable d'attaquer le 4-chlorobenzoate et une gamme assez large de catéchols chlorés. Une construction génétique à partir de cette souche tourne en partie la difficulté, mais le 2-chlorobenzoate libéré n'est pas attaqué. Une souche performante doit donc regrouper deux séries de potentialités. La première consiste à dégrader l'un des cycles en laissant un chloro- ou polychlorobenzoate comme produit résiduel. La deuxième achève le travail.

Il n'est pas rare que la biorémédiation d'un sol contaminé par un polluant, lorsqu'elle est incomplète, amène des difficultés imprévues, illustrées ici par le cas des PCB. Ces derniers sont facilement immobilisés par leur caractère insoluble et leur adsorption sur les particules du sol. Leur attaque incomplète peut engendrer un benzoate halogéné, beaucoup plus soluble, qui est susceptible de se voir

entraîner dans les eaux circulantes où il peut avoir des effets pervers supérieurs à ceux du composé de départ.

L'opéron *phbABC* est typique de toutes les souches bactériennes actives sur les PCB. Dans le métabolisme du biphényle, l'ouverture *méta* produit un intermédiaire [12] qui sera scindé par une hydrolase avec apparition d'acide benzoïque. Lorsqu'il est chloré, cet intermédiaire peut s'avérer récalcitrant et conduire au blocage. Ces transformations donnent souvent lieu à des situations compliquées. Pour en donner une idée, voici l'attaque du 4-chlorobiphényle par plusieurs espèces bactériennes (*Alcaligenes*, *Comomonas testosteroni*, *Pseudomonas putida*) **[53]**. À partir du premier intermédiaire formé apparaissent d'autres produits nés de la transformation de la chaîne latérale par réduction, hydrolyse, décarboxylation. Les réactions n'ont pas toutes été caractérisées.

Une possibilité similaire s'offre en introduisant *xylD*, le gène qui code pour une toluate dioxygénase. La tendance est donc de faire face à ces différents problèmes par la création de souches reconstituées avec des gènes de différentes origines. Malheureusement les souches construites s'avèrent souvent fragiles et peu compétitives quand elles sont répandues dans l'environnement, ce qui rend leur survie problématique.

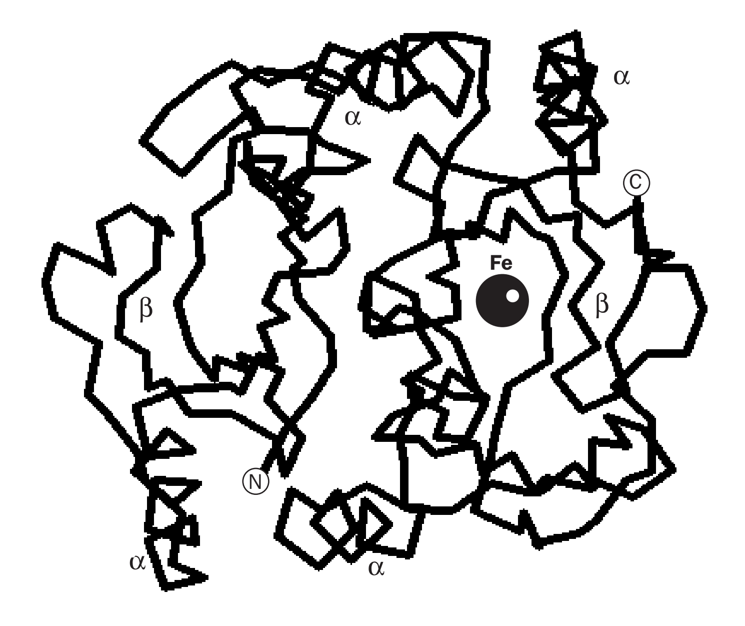
Nous retrouverons très brièvement les PCB dans un chapitre ultérieur consacré à la destruction d'herbicides. La déchloration des PCB est également possible en anaérobiose. La dégradation anaérobie a l'avantage de concerner des congénères plus fortement halogénés que ceux qui sont exposés au dioxygène.

---

12 - 2-Hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-diénoate.

10.6 - DIOXYGÉNASES DE L'OUVERTURE EXTRADIOL

Une étape clé de la dégradation du biphényle et des PCB est donc l'ouverture de l'un des cycles par dioxygénation après double hydroxylation, le plus souvent aux positions 2 et 3 (*ortho* et *méta*), avant d'être transformé en un catéchol. L'ouverture n'a pas lieu entre les deux hydroxyles, comme dans le cas des dioxygénases *ortho*, mais entre les carbones 1 et 2. Cette rupture "extradiol" est catalysée par la 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase [13], qui n'est autre que BphC. L'enzyme de *Burkholderia* LB400 offre un cadre favorable à l'étude structurale, parce qu'elle est capable d'attaquer une collection de dérivés chlorés comme signalé antérieurement. Sa structure détaillée obtenue par cristallographie **[54]** a été publiée en 1995. Une autre analyse sur la BphC d'un autre germe, *Pseudomonas* KKS102, a permis de visualiser le substrat en place sur la protéine **[55]**. Les différences fondamentales de ces enzymes avec les dioxygénases ortho ont été signalées au début de ce chapitre. Ces études ont permis de préciser la structure du site actif avec une remarquable précision et ont servi de modèle pour les enzymes de la même famille.

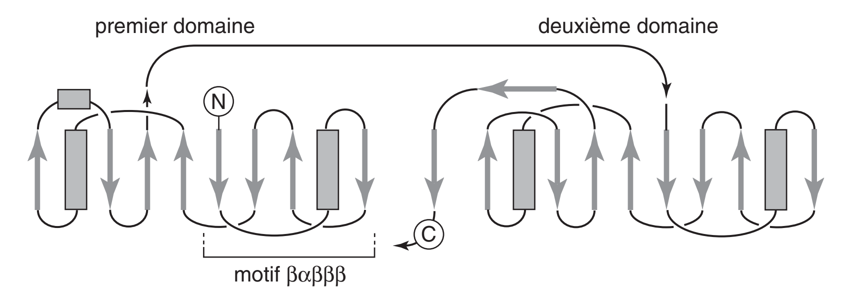


Le dessin représente chaîne primaire ou charpente polypeptidique (sans les chaînes latérales des différents acides aminés), dans une sous-unité (ou monomère) de la 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase (**BphC**). Il y a un ion Fe(II) par monomère. Les extrémités de la chaîne, qui comporte 289 résidus d'acides aminés, sont notées par N et C (N- et C-terminales). Des hélices α et des barreaux β sont repérés. L'enzyme complète a 8 sous-unités et recèle donc 8 fois cette structure, les

13 - EC 1.13.11.39.

monomères formant un arrangement régulier refermé en boule creuse d'environ 250 kDa, dont le diamètre est de 95 angströms.

En examinant cette structure, on réalise facilement qu'il existe une certaine symétrie entre deux domaines, contenant respectivement les extrémités N et C. Un caractère que nous avions déjà signalé pour la catéchol 3,4-dioxygénase. Le fer fait entorse à cette symétrie, puisqu'il n'est présent que d'un seul côté. Il s'agit de deux parties articulées de taille et de structures similaires, tout en présentant entre elles une homologie de séquences faible. Cette ressemblance structurale est renforcée par l'examen des structures secondaires, c'est-à-dire des hélices α et barreaux β le long de la séquence. Ce petit diagramme l'explique :



Structures secondaires de la catéchol 3,4-dioxygénase

Les flèches désignent des barreaux β, c'est-à-dire des segments liés à un autre barreau β par des ponts hydrogène. Les rectangles sont des hélices α. La succession de ces structures dans les replis d'une chaîne peptidique sont généralement caractéristiques d'une protéine donnée et sert à caractériser les grandes familles de protéines dont les membres sont généralement liés, soit par une même filiation évolutive, soit par une *convergence**. On peut remarquer la similitude entre les deux domaines, ainsi que la répétition, quatre fois dans la chaîne entière, de la succession βαβββ (en faisant abstraction d'une hélice et d'un barreau intercalaires). C'est pourquoi on suppose qu'il y a eu duplication d'une séquence génétique initiale à l'origine d'un premier domaine, puis une nouvelle duplication engendrant les deux domaines successifs. Le métal n'est présent que dans le deuxième domaine. Il est possible que le premier domaine ait contenu aussi du fer. Il l'aurait perdu par mutation modifiant la cavité initialement prévue pour le recueillir. Or le fer est dans un environnement caractéristique dans le site catalytique. Dans l'enzyme dépourvue de son substrat, le métal a une sphère de coordinence constituée de cinq éléments comme la dioxygénase du catéchol, deux résidus d'histidine, un résidu de glutamate et deux molécules d'eau, disposés à peu près comme les sommets d'une pyramide à base carrée. La géométrie de l'ensemble est rigidifiée par un réseau de ponts hydrogène internes à la molécule. L'entrée du substrat (2,3-dihydro-biphényl) apporte deux hydroxyles, qui remplacent deux molécules d'eau et entraînent une petite distorsion de géométrie [14] :

---

14 - Elle devient trigonale bipyramidale (deux pyramides soudées par leur base triangulaire).

Le fer du site catalytique

Le fer est à l'état réduit Fe(II) et son oxydation à l'état ferrique rend l'enzyme inactive. Cette propriété rend les dioxygénases *méta* fragiles à toute oxydation [15]. Comment cette petite mécanique fonctionne-t-elle ? Le fer de chaque monomère est accessible à la fois par une ouverture en forme d'entonnoir dirigée vers l'extérieur de l'octamère, et par une autre ouverture plus petite tournée vers l'intérieur. L'enzyme, qui est une boule creuse porteuse de 8 sites catalytiques, recevrait donc les molécules de substrat par l'extérieur. Les molécules de dioxygène, plus rapidement diffusibles, arriveraient par l'intérieur. Chaque molécule de substrat se lie à un ion métallique en expulsant deux molécules d'eau et en formant avec celui-ci deux coordinences, le complexe nommé "bidentate" dans la littérature. Dans cette opération, le fer grâce à son état réduit tend à céder un électron au substrat [16], et c'est la raison pour laquelle le métal doit rester ferreux tout au long du cycle **[56]**.

La cavité de chaque site catalytique permet à l'enzyme d'accommoder divers biphényles mono- et dichlorés ou des catéchols substitués, comme le 3-méthylcatéchol. Par contre le catéchol lui-même n'est attaqué qu'à taux très faible.

Tous ces caractères se retrouvent dans d'autres dioxygénases de type *méta* formant une famille indépendante de celle des dioxygénases *ortho* comme il a été précisé. Les archétypes de cet ensemble sont la catéchol-2,3-dioxygénase (par exemple XylE codée par le plasmide TOL) **[57]**, la protocatéchuate 4,5-dioxygénase **[58]**, et la protocatéchuate 2,3-dioxygénase **[59]**. On y trouve aussi les dioxygénases *méta* actives dans le métabolisme du naphtalène, du phénanthrène et autres entités **[60]**.

---

15 - La position du substrat dans le site actif est déterminée en le faisant pénétrer dans le cristal. Habituellement on utilise un analogue non transformable du substrat réel, de façon à éviter sa destruction au cours de l'analyse. Dans le travail de SENDA et coll., on a tout de même utilisé le 2,3-dihydro-biphényl, qui est substrat, car entre temps le fer s'était oxydé dans le cristal, et l'enzyme était devenu inactive sans modification (espère-t-on) de sa structure initiale.

16 - Le substrat se comporte alors comme un acide de LEWIS, et la situation est inverse de celle qu'on observe dans les dioxygénases de type intradiol.

Glu HOH II Fe His HOH His substrat Glu O II Fe His O His Cl O₂ Glu O II Fe His O O O His Cl OH COO⁻ O Cl Glu O II Fe His – O O—O₊ His Cl

Dioxygénation méta d'un 2,3-dihydroxy-chlorobiphényle

Au vu de ces données, il convient de résumer les propriétés des deux familles de dioxygénases scindant le cycle aromatique et contenant du fer non héminique :

Dioxygénases orth (ouverture intradiol) **[61]**	*Dioxygénases méta (ouverture extradiol)*
Enzyme codée le plus souvent sur chromosome, spécifique du substrat, transformé en un acide muconique.	Enzyme souvent codée sur plasmide, transforme une gamme élargie de substrats en un acide-alcool carbonylé (coloré en jaune).
Le fer est à l'état Fe(III). La protéine a une coloration rouge.	Le fer est à l'état Fe(II). L'enzyme est facilement inactivée par oxydation, par les complexants de Fe(II) : 2,2'-bipyridyl, *o*-phénanthroline.
Fer pentacoordonné : 2 Tyr, 2 His, H_2O à haut-spin.	Fer pentacoordonné à haut-spin, avec His, His, Glu, 2 H_2O, parfois avec d'autres résidus.
Nombre variable de monomères identiques contenant chacun du fer, ou appartenant en nombre égal à deux types similaires (Pcase), le fer étant présent dans l'un d'eux.	Structure α_4 ou α_8, avec monomères de 21 ou 35 kDa contenant chacun Fe, ou $\alpha_2\beta_2$ avec α de 35 kDa contenant Fe, β de 17 à 39 kDa.
Monomères constitués de 200-250 acides aminés, essentiellement en barreaux β. Une seule famille structurale.	Monomère de 140 résidus à un seul domaine ou 280-300 résidus en 2-domaines similaires, à 4 motifs $\beta\alpha\beta\beta\beta$. Plusieurs familles.
Activation du substrat lié au fer, réagit avec O_2, se comporte comme une base de LEWIS.	Activation d'O_2 par liaison au métal, le substrat se comporte comme un acide de LEWIS.

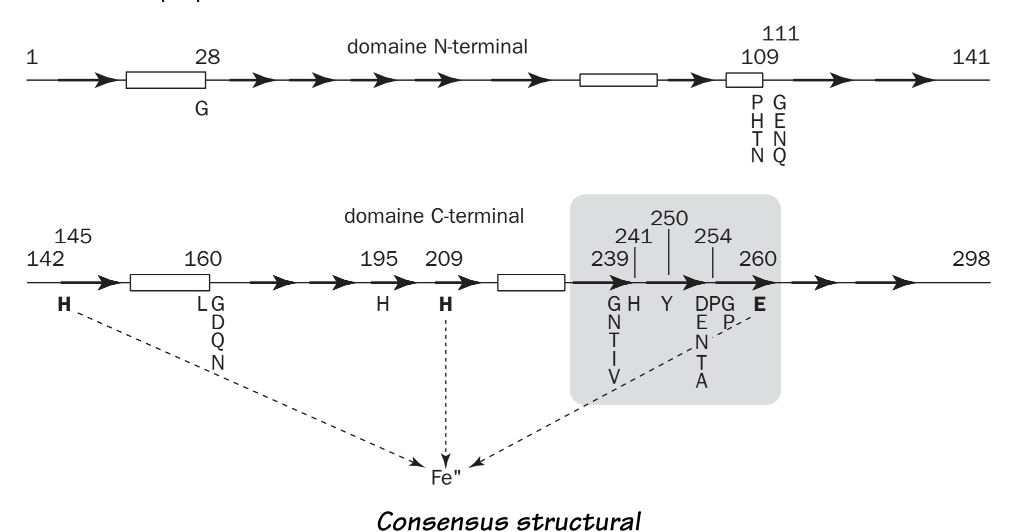
Ce n'est pas tout. La nature n'est pas avare de cas particuliers. Une dioxygénase de l'homoprotocatéchuate chez *Bacillus brevis* ne fonctionne pas avec du fer, mais avec du **manganèse** Mn(II) **[62]** comme déjà signalé. Une enzyme similaire a été décrite chez *Arthrobacter globiformis* (**MndD**), et le manganèse y est coordonné par le même dispositif que les enzymes contenant du fer, à savoir une pentacoordination avec la participation de deux résidus d'histidine et un de glutamate. L'enzyme attaque aussi le 3,4-dihydroxyphényl-lactate **[63]**. Ces enzymes se distinguent des dioxygénases à Fe(II) par leur résistance à H_2O_2.

Il est clair qu'une lignée évolutive importante a mis en place les nombreuses dioxygénases *méta* déjà recensées dans l'environnement. Ces enzymes forment un ensemble plus hétérogène que les dioxygénases *ortho*, mais présentent des similitudes de séquences et d'organisation autour du site actif **[64]**.

Dioxygénation de l'homoprotocatéchuate

Le problème sera mieux éclairci quand la cristallographie nous aura livré davantage de résultats. Néanmoins la comparaison détaillée de plus de 30 séquences permet de se faire une idée sur l'évolution de ces enzymes **[65]**. ELTIS et BOLIN (1996) distinguent une classe principale, la classe I, comportant plusieurs sous-familles, et une classe II moins nombreuse et atypique. Ces détails sont donnés ici pour permettre de se faire une idée des problèmes actuels posés par les familles d'enzymes, et par l'importance du sujet dans le cadre de l'environnement.

Classe I - la chaîne est organisée en un seul domaine catalytique, ou en deux domaines dont un seul, du côté C-terminal, est catalytique. La comparaison des séquences contenant le site actif permet de dégager une structure consensus symbolisée par un diagramme. Ont été indiqués les deux domaines du monomère catalytique, la numérotation étant celle de la BphC de *Pseudomonas* L400. Les flèches noires désignent les barreaux bêta, les rectangles sont les hélices alpha. Les positions conservées (une ou plusieurs possibilités) dans une longue liste de dioxygénases (23 au total) sont indiquées : elles sont essentielles à la structure de l'enzyme ou à son activité (ou aux deux). Trois positions interviennent dans la liaison du fer. Enfin le cadre repère la région de la séquence qui est plus particulièrement impliquée dans la construction du site actif.



Consensus structural

On distingue plusieurs sous-classes :

La sous-classe I.1 comprend des dioxygénases à masse moléculaire plus faible (21 kDa) qui ne renferment qu'un seul domaine. Ce sont en quelque sorte des enzymes où manque toute la partie N-terminale. L'analyse laisse prévoir que ces enzymes sont évolutivement les plus anciennes. On y trouve la BphC de *Rhodococcus globerulus* P6. Assez curieusement, l'espèce considérée fait trois dioxygénases différentes de ce type **[66]**, sans que l'on en comprenne exactement l'avantage physiologique [17].

Toutes les autres sous-classes ont des chaînes à domaine double. Ces deux parties ont une parenté commune. On pense que la très ancienne duplication de gènes précédant leur évolution a quelque peu brouillé les ressemblances de séquence tout en conservant l'allure générale, comme on a pu le voir à l'examen des structures secondaires de BphC.

La sous-classe I.2 renferme des dioxygénases actives de préférence sur des substrats ne comportant qu'un seul cycle aromatique, comme les catéchol 2,3-dioxygénases d'un certain nombre d'espèces. Toutes ces enzymes semblent former une même branche évolutive. La classe I.3 est une branche différente. Elle renferme des enzymes actives principalement (mais pas exclusivement) sur des substrats à deux cycles aromatiques. On y rencontre les BPhC, des dioxygénases du naphtalène et du toluène. Les sous-classes I.4 et I.5 permettent de loger chacune quelques enzymes qui ont divergé quelque peu des précédentes. Dans la sous-classe I.5 vient se ranger l'enzyme à manganèse MndD d'*Arthrobacter*, citée précédemment : malgré l'importante différence du métal, cette enzyme appartient donc au même courant évolutif.

Classe II - elle contient la catéchol 2,3-dioxygénase de *Ralstonia eutropha*, la 2,3-DHPP [18] 1,2-dioxygénase de *E. coli*, et la protocatéchuate 4,5-dioxygénase de *Pseudomonas paucimobilis*. Ce sont des enzymes dont l'analogie avec les précédentes est plus lointaine. Leur chaîne a également deux domaines apparentés. C'est le N-terminal qui construit le site actif, mais le consensus est un peu différent. Leur origine évolutive reste problématique.

Parmi ces trois ensembles de dioxygénases, deux sont plus proches l'un de l'autre (I.1 et I.2), que du deuxième (II). Certains auteurs les classent par I, II et III. Les ressemblances dans chaque ensemble sont confirmées par des comparaisons de séquence utilisant des méthodes d'alignement différentes. La molécule de certaines di-oxygenases renferment deux types de sous-unités nécessaires à l'activité, d'autres n'ont qu'un seul type de chaîne. Ces résultats restent cependant provisoires. On découvre une grande multiplicité de ces enzymes, qui occupent visiblement un créneau majeur au sein des biodégradations.

---

17 - Le germe a été rebaptisé plusieurs fois. C'est la difficulté de travailler avec les actinomycètes et apparentées, bactéries du sol aux potentialités puissantes, mais peu faciles à caractériser et sujettes à des "fantaisies" génétiques compliquées.

18 - 2,3-dihydroxy-phénylpropionate.

Il n'y a pas de ligne de démarcation nette dans l'emploi des dioxygénases *ortho* et *méta* malgré leurs différence de structure, de mécanisme et d'évolution. Les enzymes des deux types collaborent assez souvent dans une même voie métabolique et dans un même germe, parfois avec des circuits régulateurs complexes. Cette situation est connue depuis plusieurs décennies **[67]**. La participation de plusieurs dioxygénases à un même métabolisme sera illustrée sur un exemple de la section suivante. L'intervention des dioxygénases extradiol dans la biodégradation des aromatiques est donc bien un sujet aussi important que compliqué.

10.7 - AROMATIQUES AZOTÉS

La fabrication de l'aniline et l'industrie des colorants utilisent en grande quantité le **nitrobenzène**, un composé générateur de produits mutagènes dont l'épandage dans l'environnement est estimé à plusieurs millions de tonnes par an. La biodégradation des nitro-aromatiques dans son étape initiale a été évoquée antérieurement dans le cas des nitrotoluènes et nitrophénols. Il y a deux façons d'attaquer le groupe azoté : le faire sauter sous forme d'ion nitrite sous l'action d'une dioxygénase, ou le réduire en amine par une réductase. On pourra se reporter aux éléments antérieurs sur la dégradation des nitrodérivés.

Le **nitrobenzène** nous permettra de faire de nouvelles observations, et de constater l'intervention de l'ouverture *méta.* Nous retrouvons donc ce nitrodérivé entrevu au Chapitre 8, en l'examinant sous un angle plus enzymologique. Ce composé est utilisable comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie pour la croissance d'un *Pseudomonas pseudoalcaligenes* et d'un *Comomonas*, avec des stratégies différentes. Dans le premier cas **[68]**, le nitrobenzène est réduit en 2-aminophénol, qui est à son tour pris en charge par une dioxygénase. Un mécanisme similaire a été démontré dans la dégradation du 1-chloro-4-nitrobenzène **[69]**, considéré comme un polluant dangereux. Dans le second cas, le nitrobenzène est oxydé en catéchol par une nitrobenzène 1,2-dioxygénase [19].

La réaction **1**, catalysée par la nitrobenzène **nitroréductase**, est une transformation en deux étapes passant par un stade nitroso fugitif **[70]**. L'enzyme n'est pas totalement spécifique, accepte aussi le 2-amino-4-chlorophénol, les 2- et 6-amino-*m*-crésols (un méthyle en plus sur le substrat normal). Les recherches sur les nitroréductases ont été stimulées par leur présence dans la flore intestinale (classe II, sensibles à O_2, voir glossaire). et la possibilité d'apparition de radicaux toxiques. En effet leur spécificité élargie (*Clostridium*, *Eubacterium*) leur permet de fonctionner comme **azoréductases [71]**.

---

19 - Le chlore est en para par rapport au groupe nitro. Ce composé est une matière première importante pour des synthèses chimiques dans la fabrication de médicaments, de pesticides et de colorants. La production mondiale a atteint 120 000 tonnes par an. Il est cancérigène et oxyde l'hémoglobine du sang. La lutte contre sa pollution a été déclarée comme prioritaire par la CEE.

Elles décolorent ainsi un certain nombre de colorants diazoïques [20].

La réaction **2** est une isomérisation. Mais l'étape qui nous concerne principalement ici est la **3**, car c'est une ouverture *méta*, où la fonction azotée remplace un hydroxyle. La **2-aminophénol 1,6-dioxygénase**, de structure $\alpha_2\beta_2$, contient Fe(II) comme seul cofacteur et présente des analogies avec les dioxygénases *méta* déjà citées **[72]**. Elle se rattache à la classe II définie plus haut. Aussi le mécanisme doit-il ressembler assez étroitement à celui des autres dioxygénases *méta* en dépit de la présence du groupe aminé. Le semi-aldéhyde formé est oxydé ensuite en 2-aminomuconate, puis désaminé et transformé en intermédiaires du métabolisme central (cycle de KREBS).

Enzyme ou réaction		
	1 - Nitrobenzène nitro-réductase	**4 -** Nitrobenzène 1,2-dioxygénase
	2 - Hydroxyl-aminobenzène mutase	**5 -** *Réaction spontanée* [21]
	3 - 2-Aminophénol 1,6-dioxygénase	**6 -** *Vers métabolisme central* (MC)

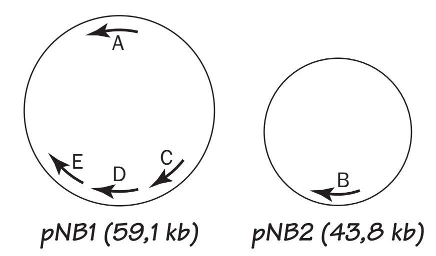
Métabolisme du nitrobenzène

Tout ce dispositif dans *Pseudomonas putida* HS12 est sous la dépendance de gènes qui sont répartis sur deux plasmides différents (pNB1 et pNB2) **[73]**. Ce sont les gènes *nbzABCDE*.

L'un d'eux, NbzA est la nitrobenzène réductase, et son gène est transcrit à contre-courant de l'opéron *nbzCDE* (2-aminophénol 1,6-dioxygénase, déshydrogénase et désaminase). Le gène *nbzB* est tout seul. Il code pour la mutase et sa transcription

20 - *Ce qui facilite leur dosage. Voir Diazoïques. Ces enzymes flaviniques réduisent le Nitrobleu de tétrazolium incolore en le rendant coloré. Le test colorimétrique est inhibé par divers nitrodérivés par un effet de compétition.*

21 - *Le cycle se ferme par réaction de l'aldéhyde sur l'amine primaire, formant une sorte de base de SCHIFF. Pour empêcher cette cyclisation avant de caractériser le produit, la fonction amine est bloquée par du méthyl-chlorocarbonate et l'aldéhyde par pentafluorophénylhydrazine. Le dérivé est purifié par chromatographie en phase gazeuse et caractérisé par spectrométrie de masse. Ce genre de difficulté n'est pas rare quand le produit d'une réaction enzymatique est instable. La méthode serait très laborieuse pour les tests enzymatiques. On se contente ici de suivre au spectrophotomètre la disparition de l'absorbance du substrat, soit à 282 nm pour le 2-aminophénol.*



pNB1 (59,1 kb) *pNB2 (43,8 kb)*

est abondante, ce qui est sans doute utile physiologiquement parce que son substrat, le dihydroxy-aminobenzène, doit être éliminé rapidement pour éviter des effets toxiques.

Nous observons ici trois faits caractéristiques. Le premier est le regroupement en opérons cataboliques hébergés sur plasmide. Il est ici imparfait si on compare avec le plasmide TOL. Le deuxième est l'existence de régulations séparées pour NbzA et NbzB. En fait ces deux protéines sont produites de manière plus ou moins constitutive, la première étant la nitrobenzène réductase et elle est faite en abondance. La transcription de l'opéron *nbzCDE*, par contre, est induite par le nitrobenzène et dépend aussi d'un activateur fait par l'autre plasmide (pNB2). Enfin le gène *nbzB* sur le plus petit des deux plasmides se trouve au voisinage de gènes identifiables comme ceux d'une résolvase et d'une transposase. Le gène *nbzB* aurait donc été introduit à la faveur d'un transposon dont la structure exacte n'a pas encore été démontée, ou qui n'est plus fonctionnel.

Cette situation évoque à nouveau la possibilité d'un véritable bricolage génétique, les souches ayant acquis de nouvelles potentialités en récupérant ici ou là une collection de gènes de différentes origines, arrivant à constituer au hasard un ensemble fonctionnel cohérent. Ce que nous observons échappe souvent à notre propre logique. La multiplication des solutions dans la nature et l'absence d'un schéma universel suggère que les plasmides de biodégradation ont été assemblés à maintes reprises à partir d'un petit nombre de pièces communes, le principal critère de leur maintien étant basé sur la sélection naturelle.

La réaction **4** du schéma est celle d'une dioxygénase qui transforme directement le nitrobenzène en catéchol et fait partir l'azote sous forme d'ion nitrite. Nous avons déjà rencontré cette situation à propos du nitrotoluène.

Pour finir voici une petite incursion dans le métabolisme du **carbazole**. Ce produit réputé cancérigène et longtemps considéré comme récalcitrant provient des fumées et goudrons de houille, conjointement avec d'autres produits similaires où l'azote est remplacé soit par du soufre (dibenzothiophène), soit par de l'oxygène (dibenzofurane, section suivante), ou simplement par un atome de carbone (fluorène). Là encore, il existe heureusement des bactéries pour s'accommoder de ces ingrédients. Elles ont même donné lieu à des études détaillées **[74]**.

La transformation du carbazole en anthranilate met à contribution deux dioxygénases successives, la **CarA** (carbazole 1,9a-dioxygénase), **CarB** (2'aminobiphényl-2,3-diol 1,2-dioxygénase) et une hydrolase (**CarC**). On observera qu'un atome d'oxygène est introduit sur un carbone adjacent à l'hétéro-atome. Il en résulte une structure instable qui entraîne l'ouverture spontanée du cycle. Ce mécanisme diffère de la double hydroxylation classique dite latérale qui est observée dans la dioxygénation du benzène ou du naphtalène. Le mode particulier observé ici est désigné comme **dioxygénation angulaire [75]**.

carbazole

CarA

CarB

CarC

anthranilate

Dioxygénation du carbazole

On la découvre dans l'attaque de divers composés comportant deux cycles aromatiques, hétérocycliques ou non, comme le fluorène, le dibenzofurane, le diphényl-éther et la dibenzo-*p*-dioxine (section suivante). La protéine CarA est une dioxygénase à 3 composants qui a été purifiée et caractérisée **[76]**. L'anthranilate est ensuite converti en catéchol, qui est oxydé à son tour par la voie *ortho*. Il y a donc une similitude avec le métabolisme du biphényle. D'ailleurs CarB possède une activité sur le 2,3-dihydroxybiphényle.

10.8 - DIOXINES !

L'évocation des dioxines s'accompagne généralement d'une certaine frayeur, car on sait qu'il peut s'agir de substances très toxiques à dose infime, facilement répandues dans l'environnement par l'activité humaine. L'attention a été attirée par l'accident survenu le 10 juillet 1976 dans une usine de Seveso, en Italie : la surchauffe et l'explosion d'un réacteur utilisé pour la fabrication de 2,4,5-trichlorophénol provoqua la dispersion de 1 à 5 kg de dioxine et une très grave pollution [22]. Célèbre également sont les méfaits de l'Agent Orange, utilisé par l'armée américaine au Vietnam comme défoliant. Ce produit répandu par tonnes était un mélange à parts égales de deux herbicides, le 2,4-D et le 2,4,5-T. Ce dernier contenait des dioxines en impuretés. Les conséquences dramatiques sur les gens et l'environnement se prolongèrent bien au-delà de l'arrêt de la guerre, et sont encore perceptibles maintenant [23]. Les dioxines sont engendrées naturellement en

22 - *Accident survenu dans une filiale du groupe Roche, nécessitant l'évacuation d'une zone étendue. Les résidus contaminés furent collectés dans 41 barils, quittèrent l'Italie par Vintimille et disparurent mystérieusement, avant d'être retrouvés seulement en 1983 dans un abattoir désaffecté du nord de la France. Le contenu fut formellement identifié et l'affaire fit scandale. Les produits furent finalement détruits dans un incinérateur à haute température par Ciba à Bâle.*

23 - *Et ne sont pas les méfaits les plus graves, cyniquement appelés collatéraux, au cours des conflits armés!*

quantités réduites par les incendies de forêt, mais la principale source de contamination reste d'origine industrielle : usines d'incinération (combustion du bois traité par PCP ou créosote), fabrication de produits organiques chlorés, notamment des herbicides, blanchiment du papier par le dioxyde de chlore. Les dioxines sont également des contaminants occasionnels du PCP et des polychlorobiphényls. Elles apparaissent comme des produits accidentels dans les gaz de combution des carburants. Les sources sont multiples et souvent difficiles à cerner précisément. Des normes sévères sont maintenant appliquées aux usines d'incinération pour limiter les émission de dioxines.

Les dioxines proprement dites représentent une famille de composés dont les chefs de file sont la **dibenzo-*p*-dioxine**, et le **dibenzofurane**. Leurs dérivés contenant du chlore, les polychloro-dibenzo-*p*-dioxines et polychloro-dibenzofuranes, sont les "dioxines" proprement dites. Il y a 75 formes possibles dans le premier cas, 135 dans le second, soit autant de congénères. Parmi eux, seuls sont toxiques ceux qui ont 4 à 8 atomes de chlore dans leur molécule, avec l'halogène présent aux positions 2, 3, 7 et 8. Les congénères ayant moins de 4 atomes de chlore sont peu toxiques. Dans le langage courant, le terme "dioxine" désigne parfois l'isomère **2,3,7,8-TCDD** [24] (ou TCDD), mais correspond généralement à un mélange de congénères. La toxicité de chacun d'eux est comparée à celle de TCDD comme référence et exprimée en **TEF**. La toxicité du mélange est mesurée en unités **TEQ** (voir la signification de *TEF et TEQ**).

2,3,7,8-tétrachloro-dibenzo-*p*-dioxine
TCDD

2,3,7,8-tétrachloro-dibenzofurane
TDF

Les dioxines

La toxicité propre à chacun des différents congénères est donc très différente selon le nombre et la position des atomes de chlore. On voit sur ce petit tableau que certaines dioxines n'ont aucune toxicité comparable à celle du TCDD :

Congénère	*TEF*	*Congénère*	*TEF*
Mono-, di-, tri-dibenzo-*p*-dioxines	0	octa-dibenzo-*p*-dioxine	0,001
2,3,7,8-tétra-dibenzo-*p*-dioxine	**1**	2,3,7,8-tétra-dibenzo-furane	0,1
Autres tétra-dibenzo-*p*-dioxines	0	Autres tétra-dibenzo-furanes	0
2,3,4,7,8-penta-dibenzo-*p*-dioxine	0,5	2,3,4,7,8-penta-dibenzo-furane	0,5
1,2,3,4,7,8,9-hepta-dibenzo-*p*-dioxine	0,01	Autres penta-dibenzo-furanes	0

Ces produits sont très stables, mais peu solubles dans l'eau et facilement entraînés par les particules du sol et les matières organiques. À cause de leur caractère lipophile, ils se concentrent facilement dans les tissus adipeux de l'organisme, où

24 - Donc la 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxine.

les méthodes d'analyse permettent de les détecter avec une très grande sensibilité, qui est de l'ordre de quelques picogrammes par kg [25]. Ce taux peut paraître extravagant par sa faiblesse, mais on estime qu'il est tout de même suffisant pour produire des effets sur la santé. Les dioxines peuvent s'accumuler dans les graisses animales (poisson, poulet) et la principale source de contamination chez l'homme est l'alimentation. Des études faites aux Etats-Unis ont montré qu'un homme de 65 kg pouvait ingérer entre 18 et 192 g TEQ par jour **[77]**, la limite tolérable étant estimée à 650 pg PEQ (10 pg PEQ . kg^{-1}) par l'Organisation Mondiale de la Santé **[78]**.

La découverte dans une rivière allemande d'un organisme bactérien capable de se développer sur dibenzo-*p*-dioxine ou dibenzofurane comme seule source de carbone (*Sphingomonas* RW1), a procuré un certain soulagement puisqu'il apparaissait que les dioxines non chlorées pouvaient être biodégradables, ainsi que certains de leurs dérivés chlorés **[79]**.

OH O OH OH
O → → → voies *ortho* et *méta*
O HO
dibenzo-*p*-dioxine OH

L'attaque faite sur la dibenzo-dioxine et le dibenzo-furane produit dans un premier cas un dérivé 2,2',3-trihydroxylé du diphényléther, du biphényle dans le second. Le catéchol apparaît comme intermédiaire et sa dégradation peut emprunter plusieurs voies (surtout la voie *méta*). Lorsque le *Sphigomonas* RW1 est confronté dans le sol avec ces dibenzo-contaminants, se pose le problème de son efficacité réelle et de sa survie. En effet des intermédiaires toxiques sont libérés et se comportent comme bactéricides. Pour évaluer la survie, une astuce consiste à introduire dans le *Sphingomonas* le gène d'une catéchol 2,3-dioxygénase (l'enzyme *méta*) **[80]**. En étalant des échantillons de sol sur boîte, on peut repérer rapidement le RW1 parmi les autres germes, car en ajoutant un peu d'une solution de catéchol ses colonies se colorent en jaune.

La plupart des recherches ont commencé avec la situation la plus simple possible, faisant appel à des produits non chlorés comme la dibenzodioxine et le dibenzofurane (lequel ressemble par sa structure au carbazole de la section précédente). Ces composants apparaissent maintenant comme facilement biodégradables, soit par des bactéries, soit par des champignons et levures. L'ennui est qu'il s'agit de contaminants non toxiques ou peu dangereux par eux-mêmes, alors que leurs dérivés polychlorés le sont bien davantage.

---

25 - L'exposition humaine est surtout d'origine alimentaire, la valeur moyenne en France étant estimée à 1,2 picogramme par kg de masse corporelle et par jour. Il faut une dose un million de fois plus élevée de 2,3,7,8-tétrachloro-dibenzodioxine pour avoir des effets toxiques aigus et immédiats ou à long terme.

Il y a en gros deux stratégies dans la nature pour éliminer les dibenzodioxines, dibenzofuranes et apparentés (fluorène, dibenzothiophène). La première repose sur l'oxygénation productrice de dérivés hydroxylés faciles à scinder par la suite. Elle est pratiquée par des enzymes qui ont éventuellement une large spécificité, comme la naphtalène dioxygénase **[81]**, et se rencontre aussi bien chez les bactéries que chez les levures **[82]**. La deuxième méthode consiste à détruire en vrac une grande diversité de liaisons chimiques à l'aide d'une peroxydase. Elle est pratiquée par les champignons de la pourriture du bois. C'est probablement la plus efficace, car elle peut s'attaquer à des substrats chargés davantage en chlore **[83]**.

La découverte de *Sphingomonas* RW1 a certainement permis de faire avancer le sujet, grâce à l'analyse de la **dibenzofurane-4,4a-dioxygénase [84]**. La réaction fait un diène-diol qui se réaromatise spontanément en 2,2'3-trihydroxybiphényle. La dibenzo-*p*-dioxine est également substrat, et on pourra comparer avec la dégradation du carbazole (p. 485). Nous retrouvons un cas de dioxygénation angulaire.

Attaque du dibenzofurane

L'enzyme est encore un système à trois composants, réductase (A) fonctionnant avec NADH, ferrédoxine (B), et dioxygénase proprement dite (C) avec deux sous-unités différentes contenant des noyaux [2Fe-2S] de type RIESKE et du fer ferreux. En fait cet appareil est redondant chez *Sphingomonas*. Il y a au moins deux réductases différentes (A1, A2) et trois ferrédoxines à noyau [2Fe-2S] **[85]** très similaires par leur séquence et leur structure à la putidarédoxine [26]. La raison de cette multiplicité n'est pas connue, mais on peut penser qu'elle correspond à une adaptation permettant de faire face à davantage de conditions à l'aide d'une meilleure palette d'outils. On connaît maintenant diverses souches bactériennes compétentes, par exemple un *Terrabacter*, Gram-positif capable de croître sur dibenzofurane comme seule source de carbone, pouvant cométaboliser la dibenzo-p-dioxine ainsi que des dérivés porteurs de 1 à 3 atomes de chlore **[86]**.

Le caractère biodégradable de la dibenzo-p-dioxine, du dibenzofurane et de quelques dérivés chlorés ne préjuge pas de la situation environnementale du TCDD et

26 - Revoir au besoin en glossaire putidarédoxine, terprédoxine, RIESKE.

du TDF, qui sont de loin les poisons les plus dangereux. Or leur rémanence dans le sol et les eaux est inquiétante, avec un temps moyen de l'ordre d'une année ! La dégradation bactérienne du TCDD est particulièrement lente **[87]**. Le facteur temps mis à part, plusieurs stratégies possibles peuvent conduire à la dégradation du DCDD, toutes à l'aide d'enzymes dont la spécificité est large à très large.

1,2,3-TCDD
Seul le cycle A non chloré
est facilement attaqué

Attaque d'une dioxine

La première est en aérobiose. Elle est pratiquée éventuellement par les champignons basidiomycètes de la pourriture blanche du bois, les *Phanerochaete*. Ces derniers, *P. chrysosporium* et *P. sordida*, attaquent la lignine en conditions de carence en azote. Les enzymes sont des peroxydases et opèrent par un mécanisme radicalaire. Une voie détaillée a été déterminée dans le cas de la 2,7-dichloro-dibenzo-p-dioxine en utilisant des extraits cellulaires. Elle comporte des réactions d'oxydation, réduction et méthylation avec élimination de chlorure. Le 1,2,4-trihydroxybenzène apparaît comme intermédiaire clé de cette voie, avant d'être converti par un mécanisme ortho en 3-oxoadipate **[88]**. Deux enzymes interviennent dans cette attaque, LiP et MnP, la seconde étant une peroxydase utilisant des ions manganèse. Chose curieuse, en tout cas utile, l'attaque est d'autant plus rapide que le substrat est davantage chloré (contrairement au cas des PCB, par exemple). Des auteurs japonais ont trouvé des conditions où *P. sordida* dégradait le TCDD à 50% en quelques semaines **[89]**, ce qui peut paraître bien lent mais reste tout de même encourageant. Nous reviendrons ultérieurement sur cet aspect particulier.

Une seconde voie est celle des bactéries qui oxydent le méthane. Elle utilise le très large spectre d'action de la méthane oxygénase, capable d'hydroxyler de nombreux substrats. Néanmoins les résultats expérimentaux ne semblent pas avoir été très convaincants.

La **déchloration réductrice** en anaérobiose est une troisième voie intéressante, car elle remplace un à un les atomes de chlore par des atomes d'hydrogène. L'avantage est de transformer les dérivés les plus toxiques, comme le TCDD, en dioxines moins chargées en halogènes et inoffensives. Des observations faites pendant plusieurs mois dans les sédiments d'une rivière américaine polluée ont montré une déchloration progressive des dérivés fortement chlorés (octa-CDD, hepta-CDD) par une population bactérienne complexe contenant des méthanogènes. Chose curieuse la méthanogénèse était significative au début du processus, et cessait avec l'apparition des produits de moins en moins chlorés, jusqu'au

stade des 1- et 2-monoCDD. L'évolution d'un tel système est probablement complexe et met à contribution à la fois des agents biologiques et des réactions chimiques causées par des métaux, polyphénols et transporteurs d'électrons membranaires **[90]**.

10.9 - VOIE DU GENTISATE

Le gentisate ou 2,5-dihydroxybenzoate est un intermédiaire clé dans le métabolisme de substrats aromatiques variés, un rôle déjà vu pour le catéchol et le protocatéchuate. Le gentisate naît de la dégradation du *m*-crésol, du 3-hydroxybenzoate, du salicylate, de l'anthranilate, et d'une variété d'autres produits. Il fait partie des produits de transformation aérobie du benzoate, comme le rappelle un plan simplifié :

Transformation du benzoate et du naphtalène

Le chemin utilisé dépend évidemment des espèces. Le passage du **3-hydroxybenzoate** au gentisate apparaît communément chez les actinomycètes **[91]**. Ce substrat est consommé exclusivement par la voie du gentisate chez *Pseudomonas acidovorans* alors que *Comomonas testosteroni* utilise aussi le passage par le protocatéchuate et une voie *méta*. L'utilisation du gentisate est très simple dans la nature, car il suffit d'une dioxygénation pour rompre le cycle et former un intermédiaire facile à transformer en pyruvate et fumarate. La voie du gentisate peut se représenter ainsi :

Transformation du gentisate

La réaction essentielle est catalysée par la **gentisate 1,2-dioxygénase**. Elle produit du maléylacétate. La naissance du fumarate ne peut se faire qu'après une **isomérisation** autour de la double liaison, produite avant ou après scission du maléylacétate par une **hydrolase**. Cette isomérisation est cruciale, car sans elle naîtrait du maléate non assimilable. Elle a besoin bien souvent d'un cofacteur qui est le glutathion (GSH), mais ce caractère ne serait pas général.

La dioxygénase (EC 1.13.11.4) a été identifiée et purifiée dans un certain nombre d'espèces bactériennes **[92]**, où elle se présente le plus souvent comme un homotétramère de 140-150 kDa contenant Fe(II), ou encore comme un dimère chez *Pseudomonas putida* et *Ps. alcaligenes* **[93]**. Elle reste encore moins bien connue que les dioxygénases *ortho* ou *méta*. L'enzyme accepte en général divers dérivés du gentisate, et celle de *Sphingomonas* peut accepter quelques substrats de remplacement comme le 5-aminosalicylate ou le 3-méthylgentisate. D'après les études spectroscopiques, notamment en RPE, on suppose provisoirement que le mécanisme catalytique ressemble à celui des dioxygénases *méta* tout en formant une famille de protéines tout à fait distincte sur le plan de l'évolution.

Le passage par le gentisate est-il commun dans l'environnement ? Probablement, car on observe cette voie chez une grande variété de micro-organismes où elle fournit une alternative aux voies *ortho* et *méta*. Nous prendrons deux exemples, le métabolisme du naphtalène et celui d'un pesticide, le Carbaryl.

Nous savons que la dégradation du **naphtalène** conduit classiquement au **salicylate** comme intermédiaire. Elle est déclenchée de deux façons. La première fait appel à la naphtalène 1,2-dioxygénase peu sélective.

Oxygénation du naphtalène

La seconde repose sur la salicylate 5-hydroxylase. Dans le cas du plasmide NAH7 de *Pseudomonas putida*, le naphtalène était transformé en salicylate (voie haute, opéron *nahABCDEF*), qui était métabolisé à son tour en pyruvate et acétaldéhyde (voie aval, opéron *nahGHIJK*), les deux parties étant réglées par un gène régulateur *nahR* **[94]**.

L'étape clé initiale catalysée par la naphtalène dioxygénase forme un *cis*-diol sur l'un des cycles aromatiques du naphtalène et substrats similaires. Cette dioxygénation est complétée par une déshydrogénation et une ouverture *méta*. Le salicylate intermédiaire est transformé en catéchol.

Un *Pseudomonas* U2 isolé à partir d'un champ contaminé par du pétrole **[95]**, peut se développer sur naphtalène et possède une naphtalène dioxygénase du type que nous connaissons, codée par le site *nahA*, qui correspond en fait à plusieurs gènes, car c'est une enzyme complexe construite sur le modèle courant : l'hydroxylase (NahA**c** + NahA**d**), la réductase (NahA**a**) et la ferrédoxine (NahA**b**). Ce qui est nouveau ici est le passage du salicylate au gentisate par la **salicylate 5-hydroxylase**, alors que le métabolisme rencontré antérieurement convertit le salicylate en catéchol, celui du naphtalène présente une bifurcation dans deux directions au niveau du salicylate, vers le catéchol ou le gentisate.

salicylate → (NADH, 2 H^+, O_2 ; NAD$^+$, H_2O, CO_2) → catéchol

Salicylate 1-hydroxylase

salicylate → (NADH, 2 H^+, O_2 ; NAD$^+$, H_2O) → gentisate

Salicylate 5-hydroxylase

Les deux hydroxylases sont des mono-oxygénases, elles utilisent NADH comme source d'électrons mais sont distinctes. La première, celle qui fait du catéchol, est une flavoprotéine catalysant toutes les opérations par elle-même. La deuxième est une enzyme complexe construite sur le même principe que la naphtalène dioxygénase ! Elle est codée comme elle par deux gènes et contient deux sous-unités de taille différente, la plus grosse étant de type RIESKE. L'enzyme fonctionne aussi en association avec une réductase et une ferrédoxine. Nous sommes donc en présence de deux modèles de mono-oxygénases attaquant le salicylate. Le premier est flavinique, décarboxyle et hydroxyle le substrat. Le second est un complexe construit comme les hydroxylases qui greffent deux hydroxyles sur le noyau aromatique : benzène, naphtalène et autres.

Le **Carbaryl** est un pesticide de la famille des carbamates [27], et sa biodegradation illustre l'intervention de la voie du gentisate. L'usage du Carbaryl est très répandu

27 - *Introduit à l'origine par l'Union Carbide. À la suite du désastre de Bhopal, en Inde, la fabrication avait été reprise par Rhône-Poulenc. Comme beaucoup d'insecticides, c'est un inhibiteur de l'acétylcholine estérase du système nerveux. Il est présent dans plus d'une centaine de préparations commerciales en combinaison avec*

dans la protection des cultures contre les insectes mais il est susceptible de nuire à l'environnement [28]. Son caractère biodégradable par diverses espèces microbiennes (*Achromobacter*, *Blastobacter*, *Arthrobacter* et *Pseudomonas*) est connu depuis 1972 **[96]** : leur pouvoir dépend de plasmides qui pourraient avoir été acquis au cours d'une phase récente de sélection. Le métabolisme du Carbaryl est greffé sur celui du naphtalène par l'intermédiaire du **1-naphtol**.

pRC1 *pRC2*

$OCONHCH_3$
H_2O
carbaryl
OH
$+ CH_3NH_2$
$+ CO_2$
1-naphtol
OH CHO
OH COO^-
salicylate
OH COO^- OH
gentisate
$H_2O + CO_2$

Dégradation du carbaryl

L'étape initiale est une hydrolyse libérant du dioxyde de carbone et de la méthylamine. Chez *Arthrobacter* RC100, qui croît sur Carbaryl comme seule source de carbone **[97]**, les enzymes responsables de la transformation en gentisate sont codées par deux plasmides différents pRC1 et pCR2. Le reste de la voie qui métabolise entièrement le gentisate dépend de gènes chromosomiques. Une opération similaire a été trouvée chez un *Pseudomonas* et d'autres espèces. Le 1-naphtol est généralement traité par la voie du gentisate. On peut se rendre compte à l'heure actuelle que ces propriétés sont le plus souvent portées par des plasmides transmissibles.

Mentionnons pour finir un cousin du gentisate qui est l'**homogentisate**, avec son atome de carbone supplémentaire. Il est engendré à partir de la tyrosine. Ce métabolisme très classique comporte une transamination en 4-hydroxyphénylpyruvate (4-HPPA), qui est transformé en homogentisate par la 4-HPPA-dioxygénase. Cette transformation aérobie diffère profondément de celle qui est pratiquée par les organismes dénitrifiants.

La réaction a une particularité qui saute aux yeux. La chaîne carboxylique s'est déplacée d'un cran sur le cycle aromatique par dioxygénation. Le mécanisme est interprété comme similaire à un déplacement NIH ou ***NIH-shift****. L'emploi de dioxygène marqué par ^{18}O a révélé que les deux atomes d'oxygène étaient effectivement incorporés dans la molécule produite, un critère essentiel pour définir une dioxygénase.

---

d'autres produits, apparaît comme relativement toxique; on suspecte un pouvoir cancérigène et son épandage nécessite des précautions.

28 - Et en particulier la destruction des abeilles !

4-HPPA — homogentisate — isom. — acétoacétate — fumarate

En particulier l'oxygène marqué n'était pas présent dans le CO_2 né de la décarboxylation. La chaîne latérale était transportée en bloc sans modification. La preuve est venue de l'emploi du deutérium. En incorporant cet isotope à la place de l'un des deux atomes d'hydrogène du groupe méthylène ($–CH_2–$) dans le 4-HPPA, on rend la molécule chirale. On constate alors que la réaction s'accompagne d'une rétention de configuration, trahissant l'absence de toute modification à ce niveau. En effet ce marquage a des conséquences directes sur le spectre RMN et toute inversion de configuration ou substitution serait facilement détectée.

Cette réaction, connue en détail chez les mammifères **[98]**, est présente chez les végétaux et les procaryotes. La structure de la dioxygénase de *Pseudomonas fluorescens* a été déterminée par cristallographie à une résolution de 2,4 Å **[99]**. Chaque sous-unité de l'enzyme, un homotétramère, a deux domaines comportant la répétition de modules structuraux $\beta\alpha\beta\beta\beta\alpha$ rappelant l'organisation de la dioxygénase *méta* déjà décrite dans ce chapitre (4-hydroxy-chlorobiphényl dioxygénase). La catéchol 2,3-dioxygénase est bâtie sur le même principe. Toutes les protéines de la même famille fonctionnent avec du fer non héminique et utilisent probablement le même mécanisme.

Le dessin montre une des voies métaboliques partant de l'homogentisate chez les *Pseudomonas*. Elle aboutit rapidement au métabolisme central. On remarquera l'isomérisation par une isomérase du composé intermédiaire, le **4-maléylacétoacétate**, et c'est encore une opération tout à fait classique. La dégradation de la tyrosine est essentielle chez les plantes et les bactéries photosynthétiques, car elle est nécessaire à la synthèse des pigments chlorophylliens comme à celle des quinones et tocophérols. Lorsque l'homogentisate n'est pas rapidement transformé, son accumulation provoque une polymérisation en un pigment soluble rouge-brun, la **pyomélanine**, encore appelée alkapton [29]. La production de pigments de ce type semble banale chez de nombreuses espèces bactériennes. On l'a mise en

29 - *En français, on écrirait plutôt alcapton. L'alcaptonurie, maladie héréditaire rare (urine foncée, atteintes articulaires) vient d'un défaut au niveau de l'homogentisate 1,2-dioxygénase. Le médecin britannique A. GARROD a identifié le premier la substance responsable du noircissement de l'urine, l'acide homogentisique, et reconnu le caractère héréditaire du désordre. Le gène humain responsable n'a été localisé qu'en 1996 par des chercheurs espagnols, soit 98 ans plus tard, grâce à une sonde nucléique fabriquée en fonction du gène de la dioxygénase du champignon Aspergillus niger.*

évidence chez *Vibrio cholerae* et *Shewanella colwiellana*, ainsi que dans des espèces marines. La signification physiologique reste mal connue. Il pourrait s'agir d'une réaction de stress, d'une résistance aux métaux, ou d'un facteur de virulence pour les espèces pathogènes. On a envisagé aussi un rôle dans la consolidation des biofims par inhibition des enzymes attaquant les polysaccaharides.

CONCLUSION

L'ouverture extradiol du noyau aromatique possède à l'évidence une remarquable souplesse pour attaquer des xénobiotiques de structure plus ou moins compliquée et porteurs de substituants comme le chlore. Il est vraisemblable que dans la nature des procédés nouveaux ont été "inventés" ou adaptés à partir de schémas anciens à l'arrivée de produits artificiels. Sur le plan de l'évolution, l'étude s'avère passionnante. La mutagénèse dirigée qui permet de modifier le site actif des enzymes dont on connaît la structure, permet sans doute d'aller vite et de créer des souches plus performantes. Vont-elles entrer dans les discussions sur les OGM ?

RÉFÉRENCES

[1] KUKOR JJ & OLSEN RH (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 4587-4594.

[2] BAYLY RC & BARBOUR MG (1984) *In "Microbial Degradation of Organic Compounds"*, GIBSON DT ed., Marcel Dekker : 253-294.

[3] NEWMAN LP & WACKETT LM (1995) *Biochemistry* **34** : 14066-14076.

[4] OLSEN RH, KUKOR JJ & KAPHAMMER B (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 3749-3756.

[5] KUKOR JJ & OLSEN RH (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 6518-6526.

[6] Hopper DJ & Taylor DG (1975) *J. Bacteriol.* **122** : 1-6 ;
BUSWELL JA (1995) *J. Bacteriol.* **124** : 1077-1083.

[7] ZYLSTRA GJ, MCCOMBIE WR, GIBSON DT, FINETTE BA (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1498-1503.

[8] POWLOWSKI J, SAHLMAN L & SHINGLER V (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 377-385.

[9] WOLGEL SA, DEGE JE, PERKINS-OLSON PE, JUAREZ-GARCIA CH, CRAWFORD RL, MÜNCK E & LIPSCOMB JD. (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 4414-4426.

[10] DAGLEY S, GEARY PJ & WOOD JM (1968) *Biochem. J.* **109** : 559-568.

[11] KITA A, KITA S, FUJISAWA I, INAKA K, ISHIDA T, HORIIKE K, NOZAKI M & MIKI K (1999) *Structure Fold Des.* **15** : 25-34.

[12] NODA Y, NISHIKAWA K, SHIOZUKA I, KADOKURA H, NAKAJIMA H, YODA K, KATAYAMA Y, MOROHOSHI N, HARAGUCHI T & YAMASAKI M (1990) *J. Bacteriol.* **172** : 2704-2709.

[13] HAN S, ELTIS LD, TIMMIS KN, MUCHMORE SW & BOLIN JT (1995) *Science* **270** : 976-980.

[14] HATTA T, MUKERJEE-DHAR G, DAMBORSKY J, KIYOHARA H & KIMBARA K (2003) *J. Biol. Chem.* **278** : 21483-21492 ;
REYNOLDS MF, COSTAS M, ITO M, JO DH, TIPTON AA, WHITING AK & QUE L (2003) *J. Biol. Inorg. Chem*. **8** : 263-272.

[15] WILLIAMS PA & MURRAY K. (1974) *J. Bacteriol.* **120** : 416-423.

[16] BURLAGE RS, HOOPER SW & SAYLER GS (1989) *Appl. Env. Microbiol.* **55** : 1323-1328.

[17] TSUDA M & IINO T (1988) *Mol. Gen. Genet.* **213** : 72-77.

[18] MARQUÉS S & RAMOS JL (1993) *Molec. Microbiol.* **9** : 923-929.

[19] WILLIAMS PA, SHAW LM, PITT CW & VRECL M (1997) *Microbiology* **143** : 101-107.

[20] KASAI Y, INOUE J & HARAYAMA S (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 6662-6666.

[21] HARAYAMA S & REKIK M (1990) *Mol. Gen. Genet.* **221** : 113-120 ;
WOLFE MD, ALTIER DJ, STUBNA A, POPESCU CV, MUNCK E & LIPSCOMB JD (2000) *Biochemistry* **41** : 9611-9626.

[22] HUGO N, ARMENGAUD J, GAILLARD J, TIMMIS KN & JOUANNEAU Y (1998) *J. Biol. Chem.* **273** : 9622-9629.

[23] HUGO N, MEYER C, ARMENGAUD J, GAILLARD J, TIMMIS KN & JOUANNEAU Y (2001) *J. Bacteriol.* **182** : 5580-5585.

[24] DUGGLEBY CJ & WILLIAMS PA (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132** : 717-726.

[25] RAMOS JL, MARQUÉS S, TIMMIS KN (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* **51** : 341-373.

[26] O'DONNELL KJ & WILLIAMS PA (1991) *J. Gen. Microbiol.* **137** : 2831-2838 ;
AEMPRAPA S & WILLIAMS PA (1998) *Microbiology* **144** : 1387-1396.

[27] YEN KM & GUNSALUS IC (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79** : 874-878.

[28] YEN KM , SULLIVAN M & GUNSALUS IC (1983) *Plasmid* **9** : 105-111.

[29] EATON RW & CHAPMAN PJ (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 7542-7554.

[30] YOU IS, GHOSA D & GUNSALUS IC (1991) *Biochemistry* **30** : 1635-1641.

[31] CANE P & WILLIAMS PA (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132** : 2919-2929 ;
TSUDA, M & IINE T (1990) *Mol. Gen. Genet.* **223** : 33-39.

[32] WILLIAMS PA, CATTERALL FA & MURRAY K (1975) *J. Bacteriol.* **124** : 679-685.

[33] ASSINDER SJ & WILLIAMS PA (1988) *J. Gen. Microbiol.* **134** : 2769-2777 ;
EATON RW (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 7757-7762.

[34] GARCIA-VALDES E, COZAR E, ROTGER R, LALUCAT J, URSING J (1988) *Appl. Env. Microbiol.* **54** : 2478-2485.

[35] CERNIGLIA CE & GIBSON DT (1977) *Appl. Environ. Microbiol.* **34** : 363-370 ;
CERNIGLIA CE & GIBSON DT (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **187** : 121-127.

[36] CERNIGLIA CE & GIBSON DT (1980) *J. Biol. Chem.* **255** : 5159-5163.

[37] KANALY RA & HARAYAMA S (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 2059-2067.

[38] MUELLER JG, CHAPMAN PJ, BLATTMANN BO & PRITCHARD PH (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 1079-1086.

[39] STORY P, PARKER H, HAYASAKA SS, RILEY MB & KLINE EL (2001) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26** : 369-382 ;
PINYAKONG O, HABE H & OMORI T (2003) *J. Appl. Microbiol.* **49** : 1-19.

[40] WEISSENFELS WD, BEYER M, KLEIN & RHM HJ (1991) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34** : 528-535 ;
KELLEY I, FREEMEN JP, EVANS FE & CERNIGLIA CE (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 800-806.

[41] VAN HERWIJNEN R, WATTIAU P, BASTIAENS L, DAAL L, JONKER L, SPRINGAEL D, GOVERS HA & PARSONS JR (2003) *Res. Microbiol.* **154** : 199-206.

[42] GIBSON DT, ROBERTS RL, WELLS MC & KOBAL VM (1973)
Biochem. Biophys. Res. Comm. **50** : 211-219 ;
CATELANI D, COLOMBI A, SORLINI C & TRECCANI V (1973) *Biochem. J.* **134** : 1063-1066 ;
FURUKAWA K, SIMON JR & CHAKRABARTY AM. (1983) *J. Bacteriol.* **154** : 1356-1362 ;
BEDARD DL, UNTERMAN R, BOPP LH, BRENNAN MJ, HABER ML & JOHNSON C (186)
Appl. Environ. Microbiol. **51** : 761-768.

[43] FINNERTY WR (1992) *Annu. Rev. Microbiol.* **46** : 193-218;
ASTURIAS JA & TIMMIS KN (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 4631-4640.

[44] SYLVESTRE M, MASSÉ R, AYOTTE C, MESSIER F, FAUTEAUX J (1985)
Appl. Microbiol. Biotechnol. **21** : 192-195 ;
SHIELDS MS, HOOPER SW & SAYLER GS (1985) *J. Bacteriol.* **163** : 882-889 ,
BEDARD DL, WAGNER RE, BRENNAN MJ, HABERL ML & BROWN JF (1987)
Appl. Environ. Microbiol. **53** : 1094-1102.

[45] HAYASE N, TAIRA K & FURUKAWA K (1990). *J. Bacteriol,* **172** : 1160-I164.

[46] HADDOCK JD, LM NADIM & DT GIBSON (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 395-400.

[47] FURUKAWA K, TOMIZUKA N & KAMIBAYASHI A (1979) *Appl. Environ. Microbiol.* **38** : 301-310 ;
FURUKAWA K, & MIYAZAKI T (1986) *J. Bacteriol.* **166** : 392-398 ;
FURUKAWA K, HIROSE J, SUYAMA A, ZAIKI T & HAYASHIDA S (1993)
J. Bacteriol. **175** : 5224-5232.

[48] SEEGER M, ZIELINSKI M, TIMMIS KN & HOFER B (1999)
Appl. Environ. Microbiol. **65** : 3614-3621.

[49] ADRIAENS P & FOCHT DD(1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 173-179.

[50] SYLVESTRE M, MASSÉ R, AYOTTE C, MESSIER F & FAUTEAUX J (1985)
Appl. Microbiol. Biotechnol. **21** : 192-195.

[51] HAVEL J. & REINEKE W (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* **62** : 163-169.

[52] MOKROSS H, SCHMIDT E & REINEKE W (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* **71** : 179-186.

[53] AHMAD D, SYLVESTRE M, SONDOSSI M & MASSÉ R (1991) *J. Gen. Microbiol.* **137** : 1375-1385.

[54] HAN S, ELTIS LD, TIMMIS KN, MUCHMORE SW & BOLIN JT (1995) *Science* **270** : 976-980.

[55] SENDA T, SUGIYAMA K, NARITA H, YAMAMOTO T, KIMBARA K, FUKUDA M, SATO M, YANO K & MITSUI Y (1996) *J. Mol. Biol.* **255** : 735-752.

[56] BRODERICK JB (1999) *Essays Biochem.* **34** : 173-189.

[57] LEE J, OH J, MIN KR, KIM CK, MIN KH, LEE KS, KIM YC, LIM JY & KIM Y (1996)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **224** : 831-836 ;
OH JM, KANG E, MIN KR, KIM CK, KIM YC, LIM JY, LEE KS, MIN KH & KIM Y (1997)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **29** : 578-581.

[58] ARCIERO DM & LIPSCOMB JD (1986) *J. Biol. Chem.* **261** : 2170-2178.

[59] WOLGEL SA, DEGE JE, PERKINS-OLSON PE, JAUREZ-GARCIA CH, CRAWFORD RL, MUNCK E & LIPSCOMB JD (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 4414-4426.

[60] DENOME SA, STANLEY DC, OLSON ES & YOUNG KD (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 6890-6901 ; TAKIZAWA N, KAIDA N, TORIGOE S, MORITANI T, SAWADA T, SATOH S & KIYOHARA H (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 2444-2449.

[61] Que L. (1989) The catechol dioxygenases, *In "Iron carriers and iron proteins"*, LOEHR T ed., VCH, New York : 469-524.

[62] QUE L, WIDOM J & CRAWFORD RL(1981) *J. Biol. Chem.* **256** : 10941-10944.

[63] WHITING AK, BOLDT YR, HENDRICH MP, WACKETT LP & QUE L (1996) *Biochemistry* **35** : 160-170 ;
BOLDT YR, WHITING AK, WAGNER ML, SADOWSKY MJ, QUE L JR & WACKETT LP (1997) *Biochemistry* **36** : 2147-2153.

[64] SPENCE EL, KAWAMUKAI M, SANVOISIN J, BRAVEN H & BUGG TDH (1996) *J. Bact.* **178** : 5249-5256.

[65] ELTIS LD & BOLIN JT (1996) *J. Bact.* **178** : 5930-5937.

[66] ASTURIAS JA & TIMMIS KN (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 4631-4640.

[67] FARR DR & CAIN RB (1968) *Biochem. J.* **106** : 879-885.

[68] LENDENMANN U & SPAIN JC (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 6227-6232.

[69] KATSIVELA E, WRAY V, PIEPER DH & WITTICH R-M (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 1405-1412.

[70] SOMERVILLE CC, NISHINO SF & SPAIN JC (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 3837-3842.

[71] RAFII F & CERNIGLIA CE (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 1731-1734 ;
RAFII F & CERNIGLIA CE (1995) *Environmental Health Perspectives* **103**, Suppl. 5 ;
RAFII F & COLEMAN T (1999) *J. Basic Microbiol.* **39** : 29-35.

[72] TAKENAKA S, MURAKAMI S, SHINKE R, HATAKEYAMA K, YUKAWA H & AOKI K (1997) *J. Biol. Chem.* **272** : 14727-14732.

[73] Park H-S & Kim H-S (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 573-580.

[74] SATO S-I, OUCHIYAMA N, KIMURA T, NOJIRI H, YAMANE H & OMORI T (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 4841-4849.

[75] NOJIRI H, HABE H & OMORI T (2001) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **47** : 279-305.

[76] NAM J-W, NOJIRI H, NOGUCHI H, UCHIMURA H, YOSHIDA T, HABE H, YAMANE H & OMO T (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 5882-5890.

[77] STANLEY JS & coll. (1990) *Chemosphere* **20** : 895-901 ;
HARDISSON C, SALA-TREPAT JM & STANIER RY (1969) *J. Gen. Microbiol.* **59** : 1-11 ;
ORNSTON MK & ORNSTON LN (1972) *J. Gen. Microbiol.* **73** : 455-464 ;
NAKAZAWA T & YOKOTA T (1973) *J. Bacteriol.* **115** : 262-267 ;
DAGLEY S. (1986) *In "The Bacteria"*, GUNSALUS IC, SOKATCH JR & ORNSTON LN eds, vol. **10** : 527-555.

[78] VAN LEEUWEN FX, FEELEY M, SCHRENK D, LARSEN JC, FARLAND W & YOUNES M (2000) *Chemosphere* **40** : 1095-1101.

[79] WITTICH R-M, WILKES H, SINNWELL V, FRANCKE W & FORTNAGEL P (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 1005-1010 ;
WILKES H, WITTICH R-M, TIMMIS KN, FORTNAGEL P & FRANCKE W (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 367-371.

[80] Halden RU, Halden BG & Dwyer DF (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 2246-2249.

[81] Resnick SM & Gibson DT (1996)) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 4073-4080.

[82] Hammer E, Krowas D, Schäfer A, Specht M, Francke W & Schauer F (1998)) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 2215-2219.

[83] Takada S, Nakamura M, Matsueda T, Kondo R & Sakai K (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 4323-4328.

[84] Bunz PV & Cook AM (1993) *J. Bacteriol.* **175** : 6467-6475 ;
Habe H, Chung J-S, Lee J-H, Kasuga K, Yoshida T, Nojiri H & Omori T (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 3610-3617.

[85] Armengaud J, Gaillard J & Timmis KN (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 2238-2244.

[86] Monna L, Omori T & Kodama T (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 285-289.

[87] Matsumura F, Quensen J & Tsushimoto G (1983) *Environ. Sci. Res.* **26** : 191-219;
Parsons JR & Storms MCM (1989) *Chemosphere* **19** : 885-892.

[88] Hammel KE, Kalyanaraman B & Kirk TK (1986) *J. Biol. Chem.* **261** : 16948-16952 ;
Valli K, Wariishi H & Gold MH (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 2131-2137.

[89] Takada S, Nakamura M, Matsueda T, Kondo R & Sakai K (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 4323-4328.

[90] Adriaens P, Chang PR & Barkovskii AL (1996) *Chemosphere* **32** : 433-441.

[91] Hammann R & Kutzner HJ (1998) *J. Basic Microbiol.* **38** : 207-220.

[92] Crawford RL, Hutton SW & Chapman PJ (1975*) J. Bacteriol.* **121** : 794-799 ;
Harpel MR & Lipscomb JD (1990) *J. Biol. Chem.* **265** : 6301-6311 ;
Suarez M, Ferre E & Martin M (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* **143** : 89-95 ;
Werwath J, Arfmann HA, Pieper DH, Timmis KN & Wittich RM (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 4171-4176.

[93] Feng Y, Khoo HE & Poh CL (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 946-950.

[94] Yen KM & Sardar CM (1988) *Crit. Rev. Microbiol.* **15** : 247-268.

[95] Fuenmayor S, Wild M, Boyes AL & Williams PA (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 2522-2530.

[96] Sud RK, Sud AK & Gupka KG (1972) *Arch. Microbiol.* **87** : 353-358 ;
Chapalamadugu S & Chaudhry GR (1991) *Appl. Env. Microbiol.* **57** : 744-750 ;
Hayatsu M & Nagata T (1993) *Appl. Env. Microbiol.* **59** : 2121-2125.

[97] Hayatsu M, Hirano M & Nagata T (1999) *Appl. Env. Microbiol.* **65** : 1015-1019.

[98] Leinberger R, Hull WE, Simon H & Rétey J (1981) *Eur. J. Biochem.* **117** : 311-318.

[99] Serre L, Sailland A, Sy D, Boudec P, Rolland A, Pebay-Peroula E & Cohen-Addad C (1999) *Structure Fold* **15** : 977-988.

Chapitre 11
Les aromatiques à l'abri de l'oxygène

Il n'a été question jusqu'à présent que de l'attaque aérobie des aromatiques. Heureusement la présence de l'oxygène de l'air n'est pas indispensable pour dégrader ces éléments dans la nature, car sinon ils risqueraient de s'accumuler indéfiniment dans les sédiments et profondeurs du sol. Heureusement leur métabolisme est activement poursuivi à l'abri de l'air, mais fait appel à des solutions originales comme la voie du benzylsuccinate. Nous découvrirons que le coenzyme A est bien souvent un cofacteur essentiel de ces transformations.

11 – Les aromatiques à l'abri de l'oxygène

Il n'a été question jusqu'à présent que de l'attaque aérobie des aromatiques. Heureusement la présence de l'oxygène de l'air n'est pas indispensable pour dégrader ces éléments dans la nature, car sinon ils risqueraient de s'accumuler indéfiniment dans les sédiments et profondeurs du sol. Le métabolisme anaérobie pour les recycler est lui aussi très actif.

11.1 - Attaque anaérobie par les dénitrifiants

Le cycle aromatique serait résistant à toute atteinte en l'absence d'oxygène moléculaire s'il n'existait des métabolismes de remplacement dont font partie la dénitrification et autres respirations anaérobies. Les organismes capables d'utiliser le nitrate et autres oxydes d'azote comme accepteurs d'électrons sont extrêmement répandus dans les eaux et les sols et cohabitent facilement avec des espèces aérobies proprement dites. Les composés aromatiques sont très abondants dans la nature et souvent massivement enfouis à l'écart du dioxygène. Ils ne sont pas uniquement des polluants libérés par l'activité humaine comme le benzène ou le phénol, mais de très nombreux produits naturels de transformation des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane), et notamment l'énorme masse de dérivés variés issus de la chimie de la lignine. La dénitrification autorise leur décomposition, mais utilise des voies distinctes du métabolisme aérobie et ce sera le sujet de cette partie. Les premières avancées ont été faites avec deux espèces dénitrifiantes proches l'une de l'autre, *Thauera aromatica* et *Azoarcus evansii*, et avec un phototrophe (*Rhodopseudomonas palustris*). Dans la majeure partie des cas, la transformation des aromatiques commence par les chaînes latérales aliphatiques qui sont rognées par oxydation. Ainsi la tyrosine (I) est désaminée et transformée en dérivés *para*-hydroxylés de l'acide phénylpropionique (II), de l'acide phénylacétique (III) et de l'acide benzoïque (IV). Ce métabolisme aboutit au *p*-crésol (V) et au phénol (VI) **[1]**.

L'acide *p*-hydroxyphénylacétique (III) est également une source d'acide homogentisique, et le tryptophane (VII) conduira au scatole (VIII), à l'indole (IX) et à l'acide salicylique (X), lui-même très répandu en chimie végétale [1].

---

1 - Possède une action hormonale dans les réactions de défense des plantes au cours d'un stress; tiré de l'écorce de saule (Salix), a conduit à l'invention de l'aspirine.

De la tyrosine au phénol

Il convient d'ajouter à ces constituants naturels les produits pétroliers devenus avec leurs dérivés des causes de pollution depuis plus d'un siècle. Ils entrent dans la catégorie des "**BTEX**".

Du tryptophane à l'acide salicylique

On peut se consoler en considérant que le pétrole est aussi un produit naturel, assimilable à une roche liquide. La Bible fait mention du bitume à propos de la construction de la tour de Babel. Il a été employé depuis des temps très anciens comme liant dans les constructions en briques. Le pétrole était connu depuis l'Antiquité, utilisé dans la pharmacopée et pour l'éclairage, connu en Chine et plusieurs pays d'orient depuis plusieurs millénaires. Plus récemment, le bitume a été utilisé par les peintres pour produire une couleur brune. Le bitume de Judée a servi aux premiers essais de photographie par Nicéphore NIEPCE, qui utilisa l'action de la lumière sur cette matière. L'entrée du pétrole dans l'ère industrielle date de 1859 quand le colonel DRAKE a fait jaillir le pétrole du premier forage en Pennsylvanie. Le pétrole brut est très hétérogène en fonction de son lieu d'extraction et contient un mélange complexe de nombreux hydrocarbures dont les composants à moins de 4 ou 5 atomes de carbone existent aussi mélangés au méthane dans le gaz naturel. L'origine du pétrole est une question passionnante, mais qui sort de notre sujet. Les géologues considèrent généralement le pétrole comme une roche liquide métamorphique recuite au cours de millions d'années à grande profondeur entre 100 et 300°C, à partir d'une substance d'origine organique appelée kérogène. Certains spécialistes continuent néanmoins à donner au pétrole une origine tellurique au moins partielle. L'un des principaux défenseur de cette théorie est Thomas GOLD **[2]** et la somme des arguments rend plausible une double origine, à la fois biogène et des profondeurs de l'écorce terrestre.

Des infiltrations naturelles de pétrole ou de bitume ont lieu en plusieurs lieux du globe depuis des milliers d'années, par exemple dans le Golfe du Mexique. Plus de 600 points ont été repérés par le programme EarthSat, car de petites quantités de pétrole suintent des sédiments et remontent à la surface en formant des nappes extrêmement fines et indécelables à l'œil nu. Trois litres de ce pétrole suffiraient pour s'étaler sur plus de 2 kilomètres carrés avant d'être détruits par les bactéries et l'action photochimique (R. MITCHELL, programme EarthSat, Janvier 2000). Les suintements sont détectés par radar à partir de satellites, car le pétrole répandu sur l'eau modifie la tension superficielle, aplanit un peu les vagues et modifie l'écho radar. On a tenté d'estimer le tonnage de ces épanchements de pétrole : près de 80 000 tonnes de produit seraient ainsi répandues sur les océans chaque année. Cette pollution est sans doute bien tolérée par l'environnement car elle est très progressive et faite dans des conditions où l'action biologique peut s'exercer. Les conditions sont bien différentes de celles des marées noires. Les hydrocarbures aromatiques ou polyaromatiques ne sont qu'une part relativement minoritaire du pétrole brut, mais ce sont les plus redoutés à cause de leurs propriétés cancérigènes.

La pollution massive par le pétrole brut résulte le plus souvent des naufrages maritimes ou de conflits armés (guerre du Golfe). Les émissions à partir des raffineries et des circuits de distribution sont généralement des hydrocarbures profondément modifiés par pétrochimie. Heureusement, comme les hydrocarbures étaient présents dans l'environnement bien avant l'industrie humaine, la nature était préparée depuis longtemps à traiter ce genre de composés. Il nous reste à en exploiter les possibilités ! La dénitrification en anaérobiose facilite l'élimination d'un foule de constituants dont la liste est assez longue pour les seuls aromatiques : toluène, éthylbenzène, xylènes **[3]**, 4-chlorobenzoate **[4]**, 4-hydroxyphénylacétate, phénylacétate **[5]**, 4-hydroxybenzoate, phtalate **[6]**, crésols **[7]**, acénaphtène et naphtalène **[8]**. Nous reviendrons ultérieurement sur le cas des monoterpènes **[9]**, du cyclohexanol **[10]**, des produits saturés et des hydrocarbures aliphatiques, tous transformables par dénitrification.

Le **phénylacétate** est libéré en abondance dans l'environnement, en grande partie par l'action des micro-organismes. Un métabolisme en milieu aéré pourrait comporter l'ouverture du cycle comme pour le toluène et autres aromatiques, une ouverture du cycle sous l'action de mono- et dioxygénases. L'action de ces enzymes est impossible en anaérobiose. Les stratégies utilisées comportent des oxydations par des accepteurs de remplacement comme le nitrate, ou des réductions du cycle provoquant la perte de son caractère aromatique. Le trait dominant de l'attaque anaérobie des acides aromatiques est l'intervention initiale du **coenzyme A**, beaucoup plus fréquente ici qu'en milieu aéré. Le coenzyme A (CoA ou HSCoA) établit avec les acides carboxyliques une liaison thioester qui est généralement indispensable à leur métabolisme. Un court rappel des propriétés du coenzyme A se trouve en glossaire.

Des *Pseudomonas* dénitrifiants attaquent le phénylacétate (PA) et le 4-hydroxyphénylacétate (4HPA) en anaérobiose. Les *Pseudomonas* ont une taxonomie souvent incertaine, mais ont une importance immense dans les biodégradations de l'envi-

ronnement. On les a longtemps considérés comme des aérobies à métabolisme respiratoire et capables d'oxyder un nombre important de composés organiques. En fait la faculté de dénitrifier a été reconnue chez de nombreuses espèces qui participent à des associations de micro-organismes dans les sols et les eaux. Une équipe allemande a mis en évidence l'oxydation du phénylacétate et du 4HPA par un *Pseudomonas sp.* **[11]**. L'attaque débute par la formation d'un thioester avec le coenzyme A sous l'effet d'une ligase, et se poursuit par un mécanisme particulier qui est l'α-**oxydation**. Le résultat est le **benzoyl-CoA**. Les trois premières réactions comportent des oxydations couplées à la réduction du nitrate en nitrite, sans intervention du dioxygène. Elles sont résumées par un schéma :

α-oxydation du 4-hydroxyphénylacétate

La première réaction **1** est typiquement celle d'une ligase. Le phénylacétyl-CoA est un intermédiaire normal du métabolisme de la phénylalanine par *Thauera aromatica* **[12]**. La deuxième (**2**) met en jeu 4 électrons, car elle équivaut à la mise en place d'un hydroxyle puis d'une oxydation en cétone. Les marquages par ^{18}O montrent que l'oxygène inséré provient de l'eau et parvient au phénylglyoxylate. Le mécanisme proposé pour cette α-oxydation fait état d'un intermédiaire énol comme l'indique la figure **[13]** :

Mécanisme de l'oxydation en α

Il y aurait donc bien deux oxydations successives à 2 électrons chacune, la première étant le départ d'un ion hydrure (H^-). Le coenzyme A et le cycle aromatique adjacents faciliteraient l'attaque nucléophile des ions OH^-, qui ne feraient que remplacer l'hydrure pour former l'énol. Ce système enzymatique est inductible et lié à la membrane. L'enzyme est facile à doser par colorimétrie à l'aide de DCIP comme

beaucoup de systèmes flaviniques, et les accepteurs naturels seraient les quinones respiratoires.

La dernière étape (réaction **3**) ressemble à la décarboxylation et oxydation du pyruvate et forme le **4-hydroxybenzoyl-CoA** (encadré). Les décarboxylations de ce type en milieu anaérobie se font habituellement à l'aide d'une ferrédoxine comme accepteur. Cette voie est l'application d'une opération banale dans la nature, consacrée à la dégradation anaérobie des acides aminés aromatiques. Le même principe s'observe au cours de l'attaque d'assez nombreux substrats aromatiques et c'est en cela qu'il est important. Ainsi la phénylalanine est métabolisée par désamination et oxydation en phénylglyoxylate par une oxydoréductase à 4 électrons. Cette enzyme membranaire est induite en présence de phénylalanine ou de phénylacétate dans les conditions dénitrifiantes.

La dénitrification n'a pas l'exclusivité de cette α-oxydation à 4 électrons. Elle ne fait qu'utiliser un mécanisme qu'on voit aussi dans les fermentations propioniques et glutamiques. On s'attend à trouver une famille d'enzymes toutes spécialisées dans des hydroxylations anaérobies de ce type. Leur origine évolutive est supposée très ancienne. Les oxygénases seraient venues les détrôner au cours de la montée de l'oxygène moléculaire dans la biosphère.

11.2 - BENZÈNE - TOLUÈNE - ÉTHYLBENZÈNE - CRÉSOL

À la liste des composés aromatiques susceptibles d'être attaqués par les dénitrifiants s'ajoute le **benzène**, un contaminant important à cause de sa présence dans les produits pétroliers, son emploi dans l'industrie des solvants, et la facilité avec laquelle il se répand dans les nappes phréatiques. Il accompagne volontiers le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes pour former en abrégé les **BTEX**. La solubilité de ces produits dans l'eau n'est pas négligeable. Elle atteint 1,8 g/L pour le benzène. Il existe des bactéries dénitrifiantes capables de minéraliser le benzène en anaérobiose. Les *Dechloromonas* isolés par COATES et coll. **[14]** sont des Gram-négatifs anaérobies facultatifs, capables d'oxyder une gamme étendue de substrats aromatiques dont le 4-chlorobenzoate, de substances humiques (AHDS) et d'acides organiques variés. L'accepteur d'électrons est le **nitrate** ou le **chlorate**, et la minéralisation complète du benzène correspond à :

$$C_6H_6 + 6\,NO_3^- + 6\,H^+ \longrightarrow 6\,CO_2 + 3\,N_2 + 6\,H_2O$$

Deux exemples d'hydrocarbures permettent de se faire une idée sur les stratégies mises en jeu au cours de la dénitrification. L'**éthylbenzène** et le **toluène** sont assez facilement biodégradables, que le dioxygène soit présent ou non. L'attaque en milieu aérobie ferait appel à des oxygénases prenant pour cible la chaîne latérale, oxydée en carboxylate, ou le noyau lui-même en donnant un catéchol. La dénitrification utilise une voie différente en deux grandes phases. La première consiste à modifier le noyau aromatique de manière à créer l'acide benzoïque, qui est ensuite condensé avec le coenzyme A en **benzoyl-CoA**. La deuxième phase consiste à

transformer celui-ci par un métabolisme réductif que nous examinerons dans la section suivante. Retenons deux faits majeurs.

1. l'oxydation du substituant latéral en acide carboxylique, acide benzoïque ou homologue,
2. la liaison thioester avec le coenzyme A. Par exemple, l'éthylbenzène et le toluène conduisent au benzoyl-CoA, le *p*-crésol au *p*-hydroxybenzoyl-CoA, et ainsi de suite en ce qui concerne les substrats aromatiques.

La transformation de l'éthylbenzène liée à la dénitrification commence par deux déshydrogénations successives pendant lesquelles un atome d'oxygène venant de l'eau est introduit. Une carboxylation et une ligation conduisent au benzoyl-acétate, puis au benzoyl-CoA et à l'acétyl-CoA [**15**].

De l'éthylbenzène au benzoyl-coenzyme A

La première intervention du coenzyme A est catalysée par une *ligase**. L'ATP est hydrolysé en AMP et pyrophosphate, et sert de source d'énergie. La deuxième intervention est une thiolyse opérant la scission du benzoyl-acétate-CoA comme indiqué par le pointillé. Les bactéries dénitrifiantes proches de *Thauera selenatis* poursuivent la minéralisation jusqu'au stade CO_2 et obtiennent une énergie globale estimée à 4,15 kJ par mole à partir des valeurs standard. Une valeur modeste qui autorise tout de même le développement de ces bactéries en l'absence d'une forte concurrence. Presque une misère ! Mais dans la nature on a tout le temps, surtout quand on est seul à savoir effectuer l'opération. Ces mêmes bactéries peuvent croître lentement par dénitrification sur pétrole brut !

Un autre exemple est celui d'un *Pseudomonas* cultivé en conditions dénitrifiantes sur le **toluène** ou sur *p*-crésol comme seul substrat de croissance [**16**]. La multiplication sur toluène était lente (un seul doublement par 24 h), mais avec un excellent rendement de croissance, soit 57 g de biomasse (poids sec) par mole de substrat (92 g). Les calculs ont montré qu'une grande partie du toluène oxydé à des fins énergétiques était minéralisée jusqu'au stade CO_2. Comment ? Les bactéries adaptées au toluène consommaient aussi le benzoate ainsi que l'alcool et l'aldéhyde correspondants. L'acide benzoïque serait produit par oxydation du méthyle présent dans le toluène, mais les différences avec le métabolisme aérobie sont très importantes.

La première étape est une hydroxylation du groupe méthyle. L'enzyme responsable ne peut pas être une oxygénase, mais une hydroxylase particulière (remplace H par OH) qui effectue en même temps une oxydation où l'atome d'oxygène est introduit à partir du solvant. Le coenzyme A intervient en aval et conduit au benzoyl-CoA.

Oxydation du méthyle par la méthylhydrolase

Le même principe s'appliquerait à la dégradation de divers substrats : 4-hydroxybenzoate, *p*-crésol, *m*-xylène. L'existence d'une oxydation directe sur le méthyle en conditions dénitrifiantes a été confirmée dans un *Pseudomonas* qui fait apparaître du benzaldéhyde et du benzoate **[17]**. La méthylhydroxylase du *p*-crésol est facile à doser par réduction du DCIP et a été bien caractérisée **[18]**. La transformation en aval passe par le *p*-hydroxy-benzoyl-CoA **[19]**.

Dégradation du p-crésol

La méthylhydrolase catalyse d'un seul coup les deux oxydations successives comme dans le cas du toluène, mais on assiste ici à la disparition de la fonction phénolique. Elle se fait au cours de la réduction du 4-hydroxybenzoyl-CoA (4HBC) en benzoyl-CoA. Cette réaction est remarquable, car elle chasse l'hydroxyle du cycle aromatique par réduction dans des conditions physiologiques, alors qu'en chimie organique des conditions brutales seraient nécessaires. L'enzyme a fait l'objet d'un examen détaillé **[20]**.

Ce scénario n'explique pas l'existence d'une minéralisation anaérobie du **benzène**. Puisque le noyau ne comporte pas de substituant carboné, le passage par un stade benzoyl-CoA semblerait improbable. Pourtant cette minéralisation en anaérobiose a été constatée dans des populations microbiennes mixtes tirées de divers sédiments. Elle peut s'accommoder d'accepteurs d'électrons variés. L'emploi de benzène marqué a prouvé la formation de phénol et de benzoate comme intermédiaires, mais l'étude en culture pure s'est avérée difficile. Deux souches de *Dechloromonas* ont été isolées comme capables d'oxyder le benzène en CO_2 et H_2O avec le nitrate comme accepteur **[21]**. La voie utilisée restait problématique. Le marquage a révélé que le carbone carboxylique du benzoate provenait du cycle. Il y aurait intervention d'un corrinoïde, suggérant la présence d'une méthyle transférase qui utilise habituellement ce type de cofacteur. Le benzène serait méthylé en toluène, celui-ci étant oxydé en benzoate **[22]**. Mais l'origine du méthyle provenant du cycle benzénique reste obscure.

L'acide benzoïque par sa fonction carboxylique est donc conduit à jouer un rôle central. Les carboxyles semblent vus par le métabolisme cellulaire comme des groupes encombrants et trop facilement ionisables qu'il faut modifier aussitôt. Leur transformation peut intervenir dans plusieurs directions, les principales étant la décarboxylation, l'estérification et la thio-estérification. Le coenzyme A est le principal acteur de la troisième solution. La liaison thioester formée avec le carboxyle conduit à un acyl-CoA et s'établit sous l'action d'une **ligase**. Rappelons qu'une ligase hydrolyse l'ATP en AMP et pyrophosphate. Elle a pour effet de bloquer la réactivité du carboxyle dans l'acyl-CoA et les transformations peuvent alors se dérouler ailleurs sans entrave dans la molécule. Les ligases ont une fonction capitale dans le métabolisme anaérobie du benzoate et de ses dérivés, le benzoyl-CoA étant un point de convergence des voies métaboliques utilisant une foule de substrats aromatiques **[23]**. La benzoate ligase est stable à l'air et facile à doser **[24]**.

Les acides aromatiques sont communément présents en faible quantité dans les sols **[25]**. Les bactéries compétentes sont armées pour récolter ces substrats même lorsqu'ils sont présents à l'état de traces, et de les concentrer dans leur cytoplasme. L'intervention d'une ligase représente presque toujours l'étape centrale dans l'utilisation anaérobie de ces produits. Par exemple le phototrophe *Rhodopseudomonas palustris* n'a pas moins de trois ligases capables de traiter le benzoate **[26]**. L'enzyme principale est une benzoate-CoA ligase entourée par deux autres enzymes spécifiques du *p*-hydroxybenzoate. Ces dernières acceptent également le benzoate. La même espèce élabore deux ligases supplémentaires actives sur le cinnamate **[27]**. Force est de constater que les ligases sont légion dans la nature et largement exploitées en anaérobiose. Leur pH optimum est le plus souvent du côté alcalin (pH 8,2-9,3). La reconnaissance spécifique du benzoate par une ligase se fait avec une affinité apparente élevée (K_m de 1 à 10 µM), et il en est souvent de même pour les autres substrats. La plupart sont inductibles, non seulement par leurs substrats habituels, mais par des composés divers appartenant à la même famille chimique **[28]**. En somme quand les bactéries rencontrent ces substrats, elles se hâtent de se munir des ligases appropriées, la précaution nécessaire afin de pouvoir les utiliser !

Les ligases ont des similitudes structurales rendues perceptibles par l'examen des séquences. Ces enzymes se révèlent comme des outils fondamentaux dont l'emploi date certainement des âges les plus lointains de l'évolution. Leur mécanisme révèle des détails intéressants. Toutes possèdent dans leur site catalytique une fonction thiol qui est chargée d'établir avec le substrat, une liaison covalente transitoire de type thioester. L'étape suivante du cycle catalytique consiste à basculer le substrat de cette fonction thiol à une autre, en l'occurence celle du coenzyme A. Les données sont néanmoins encore parcellaires.

Revenons maintenant au devenir du benzoyl-CoA. La liaison thioester avec le coenzyme A favorise l'étape suivante qui est une réduction du cycle conduisant à la perte de son aromaticité.

Désaromatisation du benzoate

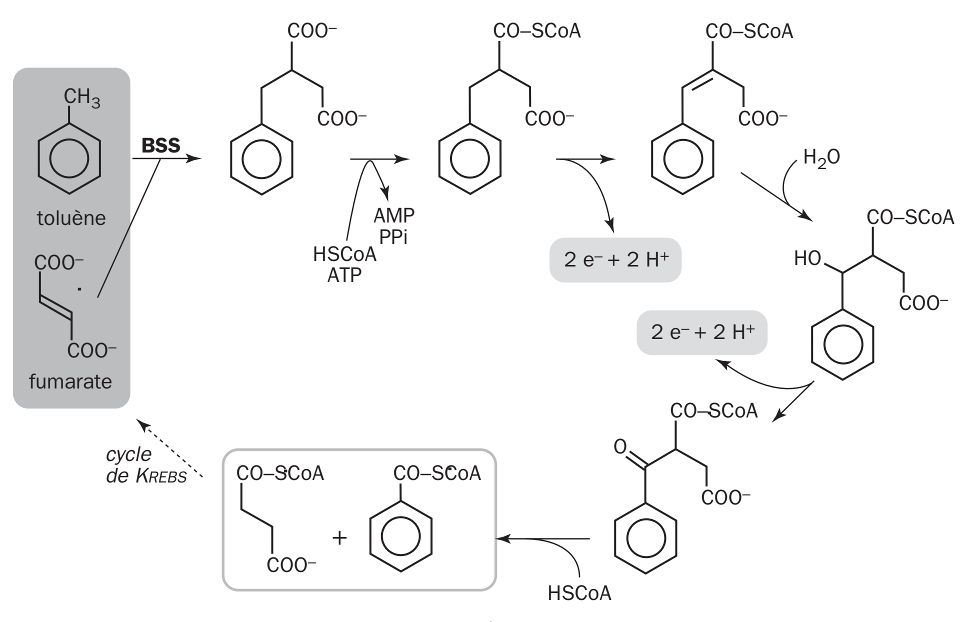
Pourquoi la liaison thioester est-elle essentielle ? En son absence, la réaction sur le cycle du benzoate de départ se heurterait à un potentiel si bas qu'elle serait impossible à utiliser dans les conditions physiologiques. La liaison thioester a pour effet de remonter le potentiel, qui reste tout de même encore très bas, de l'ordre de – 1300 mV. En outre la réduction du benzoate n'est possible qu'après franchissement d'une barrière d'activation très élevée (plus de 120 kJ/mole), et la liaison thioester a pour effet de l'amoindrir **[29]**. La réduction du benzoyl-CoA apparaît tout de même sous un jour peu favorable. La difficulté est donc contournée par un apport d'énergie supplémentaire et l'opération est tirée par l'apport énergétique de deux molécules d'ATP qui sont hydrolysées en 2 ADP et 2 ions phosphate. Les deux électrons sont donc ajoutés au cycle aromatique qui est désaromatisé en un diénoyl-CoA (soit le cyclohex-1,5-diène-1-carboxy-CoA).

Les interventions successives de la ligase et de la réductase sont donc relativement coûteuses en énergie puisqu'elles consomment au total 3 ATP par mole de benzoate. Cependant la ligase libère du pyrophosphate dont l'hydrolyse par une pyrophosphatase déplace l'équilibre réactionnel en faveur du thioester. On admet que l'étape de réduction s'exécute par les apports séparés des deux électrons, en alternance avec des protons. Chaque ATP hydrolysé correspondrait à l'injection d'un électron, à la manière du principe similaire aperçu dans la nitrogénase, une enzyme gourmande en énergie. L'hydrolyse de chaque ATP produirait un changement structural qui faciliterait l'injection d'un électron sur la cible. C'est sans aucun doute à ce prix que la désaromatisation peut avoir lieu. La réductase possède 4 sous-unités, qui travaillent peut-être deux par deux en alternance. Après une première réduction du benzoyl-CoA, la suite du métabolisme devient plus aisée car la stabilité intrinsèque du noyau aromatique est perdue.

En conclusion, l'examen rapide de cette question nous a montré le rôle central du benzoyl-CoA dans le métabolisme anaérobie des aromatiques, l'importance des ligases et de la réduction du cycle. Celle-ci étant forte consommatrice d'énergie, il est concevable que les cellules doivent disposer de moyens suffisants pour y faire face. C'est pourquoi les bactéries tirant leur énergie de la dénitrification sont communément rencontrées dans ce type d'activité. Une espèce utilisant l'énergie d'une fermentation sera davantage handicapée pour métaboliser le benzoate. Il faut se rappeler néanmoins que la microflore des sols et des eaux fonctionne en communautés complexes où les différents partenaires échangent des substrats. La faiblesse des moyens d'une espèce anaérobie donnée pour transformer les aromatiques n'est donc pas a priori rédhibitoire, puisqu'elle peut bénéficier de l'activité complémentaire d'autres organismes.

11.3 - LA VOIE DU BENZYLSUCCINATE

Les connaissances concernant la destruction anaérobie de composés aromatiques comme le toluène sont assez récentes. Le passage du toluène au benzoate a été rencontré précédemment et mettait en jeu une méthylhydrolase. Les premières souches capables de métaboliser le toluène en anaérobiose sont apparues dans la littérature à la fin des années quatre-vingt, et il fut reconnu que l'introduction d'un atome d'oxygène dans le substrat se faisait à partir de l'eau. Ce mécanisme a donc soulevé une grande curiosité. Une voie distincte et originale transforme le toluène en faisant intervenir du fumarate dans un cycle réactionnel important qui retiendra l'attention ici. La **benzylsuccinate synthase** catalyse la première étape **[30]**. Le benzylsuccinate a été identifié chez *Thauera aromatica* et un *Pseudomonas* (souche T) comme produit d'addition du groupe méthyle sur la double liaison du fumarate. L'*o*-xylène est traité par un cycle comparable dont le principe général est le suivant **[31]** :



Cycle du fumarate

Il convient de faire les observations suivantes :

- Le cycle aromatique n'est pas attaqué dans ce cycle que la présence d'un méthyle contribue à stabiliser, et une réduction directe serait encore plus difficile que celle du benzoate. L'étape essentielle de départ est celle de la benzylsuccinate synthase (**BSS**) catalysant une réaction d'addition sur la double liaison du fumarate.
- Les étapes successives imitent une ***β-oxydation**** similaire à celle d'un acide gras. Deux oxydations se succèdent et deux molécules de coenzyme A interviennent. La deuxième rompt le substrat par thiolyse.
- La voie aboutit au benzoyl-CoA et au succinyl-CoA. Ce dernier fait retour au fumarate par le cycle de Krebs en deux réactions. La participation cyclique du fumarate à un cycle en alternance avec le succinyl-CoA ou le succinate n'est pas unique dans la chimie cellulaire. Les manuels courants décrivent le cycle de l'urée et la biogénèse des purines, où on peut observer des réactions similaires. La nature utilise ce qu'elle sait faire pour la solution de problèmes variés !

La benzylsuccinate synthase n'est pas totalement spécifique, car elle agit aussi sur l'**o-xylène**. Celui-ci ne peut pas servir de substrat de croissance pour les bactéries étudiées car ses transformations en aval sont bloquées. Reste à savoir si le mécanisme aperçu ici avec le toluène est banal dans la nature. C'est possible. La synthase a été examinée en détail dans le dénitrifiant *T. aromatica* et d'autres espèces parmi lesquelles des phototrophes, des réducteurs du sulfate et des méthanogènes **[32]**. Le dénitrifiant *Azoarcus sp.* est capable de minéraliser entièrement le **toluène** et le **m-xylène**.

La benzylsuccinate synthase est inactivée par l'oxygène en quelques secondes de manière irréversible. La transcription des gènes correspondants n'a lieu qu'en anaérobiose. L'enzyme est flavinique et possède une structure $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ vérifiée par spectrométrie de masse. Elle est déterminée par 4 gènes formant un opéron d'une longueur d'environ 4,5 kb.



L'opéron bssABCD (Thauera aromatica)

Les 4 gènes sont donc transcrits d'un seul tenant. Les sous-unités α (92 kDa) sont codées par *bssA*, les β par *bssB* (12 kDa) et les γ par *bssC* (10 kDa). Le polypeptide correspondant à *bssD* ne fait pas partie de l'enzyme. C'est une protéine annexe dont la fonction est d'activer la benzylsuccinate synthase. Comment ? L'analyse des séquences et les recherches sur l'enzyme permettent de bâtir une hypothèse cohérente. Elle aurait pour fonction de stabiliser un radical.

Dans l'illustration reprise de LEUTHNER et coll., un fragment de séquence de la benzoyl-succinate synthase (sous-unité α, *Thauera aromatica*) est aligné avec d'autres fragments appartenant d'une part à des pyruvate-formiate lyases (Ecp, Hip, Cpp) et à une ribonucléotide réductase (des informations succinctes sont données en glossaire).

```
bss : DHVQFNNVVSTEEMKAAQREPEKHQDDLLIV RV S G F--SARFVDIPTYG Q NTIIA R NE
Ecp : QHIQFNNVVNADTLREAQQRPQDYAGGLLVV RV A G Y--SAFFVELSKEI Q DDIIR R TA
Hlp : QHLNVNNVLNREMLLDAMENPDKYPQQLLTI RV S G Y--AVRFNRLTKEQ Q QDVIT R TF
Cpp : HHLNVNNVMNRETLIDAMNNPDKYPTTLLTI RV S G Y--AVNFNSLSKDH Q KEVIS R TF
ndr : TGEFECCTSKGFTPCKCGNHDASRVSSVVTR RV C G YLGSPDARPFNAGK Q EEVKR R VK
```

bss - Benzylsuccinate synthase A de *T. aromatica*

Ecp - Pyruvate-formiate lyase d'*E. coli*

Hlp - Pyruv. formiate lyase d'*Haemophilus influenzae*

Cpp - Pyruvate-formiate lyase de *Clostridium pasteurianum*

nrd - Nucléotide réductase d'*E. coli*

Comparaison de séquences avec un fragment de benzylsuccinate synthase (bss)

Pourquoi le choix de ces protéines ? Parce que ces enzymes sont connues pour avoir un fonctionnement radicalaire. La chaîne de synthase α longue d'environ 850 acides aminés porte à la position 825 un reste essentiel de glycine-(G) qui est transformé en radical par une réduction à un électron.

Les positions identiques entre les 5 protéines ont été encadrées. D'autres similitudes existent ailleurs dans les 5 séquences lorsque des acides aminés de même nature (hydrophobes, ioniques…) sont placés au même endroit. Les ressemblances les plus nettes sont avec les pyruvate-formiate lyases, qui sont des protéines caractéristiques du métabolisme anaérobie. Voici un bref rappel de leur importance. La décarboxylation du pyruvate n'est pas une oxydoréduction, contrairement à ce qui se passe en aérobiose. À titre de comparaison :

En présence de O_2 :

$$\text{Pyruvate} + \text{Coenzyme A} \longrightarrow \text{Acétyl-coenzyme A} + CO_2 + 2\,e^- + 2\,H^+.$$

En anaérobiose :

$$\text{Pyruvate} + \text{Coenzyme A} \longrightarrow \text{Acétyl-coenzyme A} + \text{HCOOH}.$$

La première réaction est catalysée par un complexe enzymatique connu classiquement et décrit dans tous les manuels. Il intervient comme pyruvate déshydrogénase (aérobie), renferme du TPP et de l'acide lipoïque. Les électrons sont récupérés par la partie flavinique et apparaissent en NADH. La deuxième ligne correspond à la pyruvate-formiate lyase : au lieu de libérer du CO_2, elle produit de l'acide formique qui équivaut à du CO_2 emportant avec lui les deux électrons. Le complexe enzymatique et son mécanisme sont entièrement différents du premier, il renferme des noyaux fer-soufre et fonctionne avec une ferrédoxine. L'acide formique ou formiate (à pH 7) est souvent éliminé comme produit de fermentation, scindé en $CO_2 + H_2$ par la *formiate hydrogène lyase**, ou utilisé comme donneur d'électrons dans la dénitrification. Cette lyase fonctionne comme la benzylsuccinate synthase avec un radical porté sur glycine. Les *ribonucléotide réductases** ont aussi un tel radical.

Revenons à la synthase. La présence d'un radical glycyle dans la protéine a été confirmée par spectroscopie RPE [**33**] et l'enzyme a besoin d'une **activase**, enzyme codée par *bssD*, qui est le premier gène de l'opéron aperçu plus haut. L'activase BssD présente des analogies avec d'autres activases spécialisées sur des lyases et réductases radicalaires. L'activase aurait pour rôle de stabiliser le radical glycyle par un mécanisme mal élucidé. Au cours du cycle catalytique de la benzylsuccinate synthase, le radical glycyle fixerait un atome d'hydrogène sur un

site cystéine voisin, transformé à son tour en radical cystéyle. Celui-ci attaquerait le méthyle du substrat pour en faire un radical réactif sur le fumarate : en somme, une succession de radicaux par ricochets.

On voit sur le schéma que la réaction engendre un radical benzylsuccinyle. Ce dernier reprend à l'enzyme un atome d'hydrogène qui est repéré en caractère gras. Son addition pour former un méthylène ($–CH_2^–$) a été démontrée comme stéréospécifique par les expériences faites à partir de toluène où tous les atomes d'hydrogène sont remplacés par le deutérium (D).

Synthase radicalaire

L'enzyme prend au toluène un atome de deutérium qui se retrouve dans le produit de la réaction et crée un carbone asymétrique (–CHD–). Sa chiralité est parfaitement détectable en RMN et occupe une orientation précise.

Pourquoi la benzylsuccinate synthase est-elle immédiatement inactivée par O_2? On l'explique par la rupture de la chaîne polypeptidique au niveau du radical glycyle. Le dessin est une hypothèse de travail avancée par WAGNER et coll. **[34]**. On voit qu'O_2 réagit directement avec le radical. La rupture de la chaîne fait tomber le fragment C-terminal restant.

Inactivation de la synthase par l'oxygène

Lorsque la synthase a été inactivée par l'oxygène, une seule chaîne est ainsi tronçonnée, et la formule de l'enzyme complète passe de $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ à $\alpha\alpha'\beta_2\gamma_2$. On en déduit que l'enzyme ne porte un radical que sur une seule chaîne. La sensibilité de l'enzyme à O_2 illustre l'incompatibilité entre certaines biodégradations et la présence du dioxygène. La benzylsuccinnate synthase pourrait représenter le modèle des alkylsuccinate synthases, enzymes d'une portée plus générale, peut-être essentielles pour la dégradation des hydrocarbures aliphatiques en anaérobiose. L'éthylcyclopentane, par exemple, serait métabolisé par ce procédé **[35]**.

11.4 - LA DÉSHYDROXYLATION DU CYCLE AROMATIQUE

Le phénol n'est pas seulement un polluant industriel, mais le premier terme d'une série de composés phénoliques exsudés à faible dose par les racines des plantes ou faisant partie de la chimie du bois. Aussi n'est-il pas très étonnant que la flore microbienne se soit adaptée depuis le fond des âges à leur dégradation. Le phénol lui-même a des vertus antiseptiques et inhibe fortement le développement de la microflore à 1-20 ppm, ce qui rend dangereux comme contaminant. Cette section tente de décrire des opérations biologiques inhabituelles et un peu difficiles. Nous savons que le phénol est biodégradable en aérobiose. Il l'est aussi fort heureusement à l'abri de l'oxygène moléculaire. Il est converti en 4-hydroxybenzoate et son métabolisme converge avec celui du toluène et du *p*-crésol décrit dans la section précédente. La biodégradation du phénol au cours de la dénitrification a été découverte en 1977. Elle est réalisée notamment par des β-protéobactéries du genre *Azoarcus* **[36]**.

Carboxylation du phénol

Le phénol est pris en charge par la 4-hydroxybenzoate décarboxylase (EC 4.1.1.61), ou carboxylyase, selon une réaction réversible, mais l'équilibre thermodynamique est en faveur du phénol. Chez *Thauera aromatica*, c'est un peu plus compliqué. Le phénol est d'abord phosphorylé en phénylphosphate à partir d'ATP par une kinase avant d'être carboxylé (avec départ du phosphate) par une décarboxylase distincte de la précédente [2].

---

2 - La carboxylation du phénol est connue en chimie sous le nom de synthèse de KOLBE, et s'oriente surtout en ortho pour faire l'acide salicylique. La carboxylation à chaud en para en présence de potasse s'appelle réaction de KOLBE-SCHMITT.

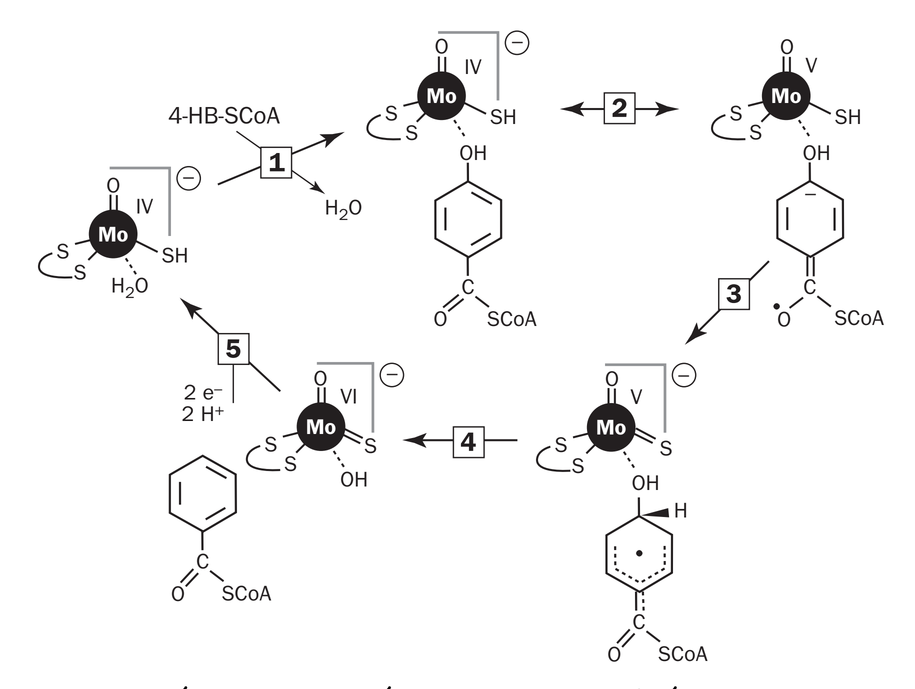
La carboxylation du phénol demande de l'ATP comme apport d'énergie. Une étape intermédiaire fait du phénylphosphate. La carboxylation est extrêmement sensible à l'oxygène et nécessite des ions manganèse. La réaction inverse transforme le 4-hydroxybenzoate en phénol et CO_2 et s'observe dans *Clostridium hydroxylbenzoicum*, une espèce des sédiments d'eau douce spécialisée dans des fermentations. Cette espèce ne transforme le 4-hydroxybenzoate et le 3,4-dihydroxybenzoate (protocatéchuate) que par décarboxylation avec deux enzymes séparées très sensibles à l'oxygène **[37]**. Le phénol et le catéchol respectivement formés ne sont pas métabolisés à leur tour. Ces enzymes catalysent aussi la réaction inverse de carboxylation. On peut s'interroger sur la signification de ces conversions en aller et retour, puisque les bactéries ne devraient en tirer aucun bénéfice net pour leur croissance. L'explication est sans doute à trouver par des échanges de métabolites au sein de populations mixtes, où chaque partenaire fournit des substrats utiles aux espèces associées tout en tirant profit en retour d'autres produits de transformation. En somme la politique du troc.

Une ligase spécifique lie le 4-hydroxybenzoate au coenzyme A pour faire un thioester. La 4-hydroxybenzoyl-CoA réductase (ou 4HB-CoA réductase) de *Thauera aromatica* est une protéine fer-soufre oligomérique (260 kDa, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$) contenant plusieurs cofacteurs fonctionnant à très bas potentiel (– 350 mV) et son dosage s'opère avec un viologène réduit comme donneur d'électrons. L'enzyme n'est induite strictement qu'en anaérobiose et correspond à un système assez commun dans l'attaque des phénols à l'abri de l'air. Une enzyme similaire active sur le 3-hydroxybenzoyl-CoA (l'isomère *méta*) a été trouvée. La séquence de l'enzyme se retrouve sous une forme homologue chez un phototrophe, *Rhodopseudomonas palustris [***38***]*. Il y a des analogies avec la xanthine oxydase et plusieurs protéines de la même famille, ainsi qu'avec la *CODH flavinique**. Il y a cependant une différence importante. Les protéines de cette famille oxydent en général leur substrat en y introduisant un hydroxyle ou une fonction oxygénée, alors qu'ici la réductase fonctionne dans l'autre sens.

La 4HB-CoA réductase a deux parties symétriques de composition $\alpha\beta\gamma$ renfermant chacune du molybdène, deux noyaux [2Fe-2S], un [4Fe-4S] et FAD. Le molybdène est dans un cofacteur appelé molybdoptérine mononucléotide du même type que trouvé dans la nitrate réductase. L'ensemble forme une chaîne de transport d'électrons interne à l'enzyme, allant du fer-soufre au molybdène. Tous les éléments ont un très bas potentiel, comme l'indique le petit tableau, où la flavine passe par un intermédiaire radicalaire, et le molybdène par un intermédiaire Mo(V).

Couple redox	*E'° (mV)*	*Couple redox*	*E'° (mV)*
$[2Fe\text{-}2S]^{+2}/[2Fe\text{-}2S]^{+1}$	– 255	$FAD/FADH^0$	– 250
$[2Fe\text{-}2S]^{+2}/[2Fe\text{-}2S]^{+1}$	– 205	$FADH^0/FADH_2$	– 470
$[4Fe\text{-}4S]^{2+}/[4Fe\text{-}4S]^{1+}$	– 465	Mo(VI) /Mo(V)	– 380
		Mo(V) /Mo(IV)	– 500

Il est clair que tous les potentiels indiqués sont trop bas pour être compatibles avec l'aérobiose. La véritable force de frappe pour effectuer la difficile réduction de la fonction phénol est le molybdène (IV). Son potentiel est un des plus bas connus dans le monde biologique hormis le cas de la photosynthèse. La réduction d'un phénol n'est d'ailleurs pas aisée en chimie. Elle nécessite des réducteurs efficaces comme la poudre de zinc, et la réduction peut aller jusqu'au stade cyclohexane. Pourtant la réduction biologique du phénol par l'hydrogène moléculaire est favorable énergétiquement, car le passage du 4-hydroxybenzoate au benzoate et à l'eau par H_2 produit 59 kJ/mole. Les bactéries sont donc dans la situation paradoxale de disposer d'une source d'énergie relativement riche, mais qui fait intervenir une réaction très difficile. Le mécanisme de la réductase par le modèle de BOLL, FUCHS et coll. (2001) reste hypothétique. Il est corroboré par les données spectroscopiques et par les analogies avec d'autres enzymes à molybdène de la famille de la xanthine oxydase. Le molybdène va de Mo(VI) à Mo(IV) au cours des oxydations faites par ces enzymes, le cheminement inverse de Mo(IV) à Mo(VI) étant observé ici. On distingue 5 étapes dans ce modèle.



Mécanisme hypothétique de la 4-HB-CoA réductase

Le substrat se lie par son hydroxyle sur Mo(IV) en expulsant une molécule d'eau (**1**). Il est obligatoirement sous forme de thioester avec le coenzyme A, puis un transfert de charge du Mo au substrat crée un anion radical (**2**), et le métal est oxydé en Mo(V). Le cofacteur transmet alors un proton à la position *para* du substrat. Le cycle est temporairement désaromatisé et engendre un radical stabilisé par la liaison thioester avec le coenzyme A (**3**).

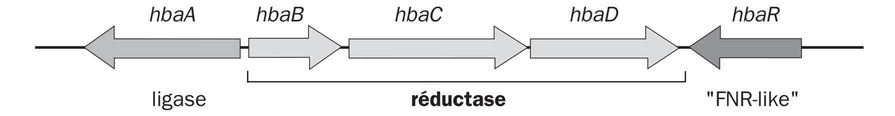
La liaison carbone-oxygène se rompt, le cycle est ré-aromatisé avec apport d'un deuxième électron aux dépens du métal (**4**), qui passe à l'état Mo(VI). Finalement une réduction à deux électrons (**5**) renvoie le molybdène à la case départ, soit Mo(IV).

D'où viennent les électrons réducteurs à la cinquième étape ? Le donneur est une ferrédoxine réduite comportant 2 noyaux [4Fe-4S] travaillant à des potentiels extrêmement bas, de – 435 mV et – 580 mV. Cette ferrédoxine a des caractères inhabituels et n'est qu'une étrangeté de plus dans ce métabolisme anaérobie **[39]**. En fait le véritable donneur d'électrons est l'hydrogène substrat d'une hydrogénase, et la ferrédoxine sert de transporteur intermédiaire. La flavine (FAD•), elle-même à très bas potentiel, serait une porte d'entrée d'un cheminement électron par électron selon le canal :

$$\text{FAD}^{\bullet} \longrightarrow \text{premier [2Fe-2S]} \longrightarrow \text{deuxième [2Fe-2S]} \longrightarrow \text{Mo.}$$

Mais l'enzyme comporte également un noyau [4Fe-4S] de – 465 mV. Il est logé dans une extension de la chaîne β qui n'existe pas dans les autres protéines de la même famille, et se trouve très proche de la flavine. Ce serait donc peut-être la véritable porte d'entrée. Cette enzyme extraordinaire a visiblement un haut degré de sophistication et achemine par petits pas les électrons nécessaires à la difficile réduction du substrat.

Rhodopseudomonas palustris possède une réductase qui ressemble à celle de *Thauera*. Cette espèce phototrophe appartient au groupe des pourpres non-sulfureuses. Elle peut croître à la lumière et en anaérobiose, ou inversement à l'obscurité avec aération. En présence de 4-hydroxybenzoate dans le milieu de culture, l'anaérobiose induit la ligase (qui fait la soudure au coenzyme A) et la 4HB-CoA réductase. Il y a expression de 4 gènes, dont un pour la ligase et trois pour les trois chaînes de la réductase, placés ensemble sous le contrôle de la protéine **HbaR**.



Gènes de R. palustris

La nécessité physiologique d'une régulation semble évidente, puisque le métabolisme du 4HB-CoA par sa réductase ne se fait qu'à très bas potentiel et nécessite une batterie de facteurs coûteux. Sa mise en place en présence de dioxygène ne se ferait qu'en pure perte. D'autre part les gènes concernés ne doivent s'exprimer que si le substrat 4HB-CoA est présent. La protéine HbaR est donc chargée de superviser les opérations. L'intérêt de cette protéine vient de ce qu'elle fait partie de la super-famille de régulateurs dont *FNR** et *CRP** sont les chefs de file. Ces protéines ont certaines analogies structurales, sont des régulateurs positifs des gènes impliqués dans l'anaérobiose, comme ceux de la dénitrification (FNR), ou de la mobilisation de ressources énergétiques (CRP). La protéine FNR est sensible aux conditions oxydoréductrices, alors que CRP régule un catabolisme en fonction de l'AMP cyclique. Le travail de EGLAND et HARWOOD **[40]** montre que HbaR

ne détecte pas l'anaérobiose, mais la présence du substrat, en conséquence de quoi elle est inductrice des autres gènes *hbaA* et *hbaBCD*. Quel est le facteur chargé de surveiller la présence d'O_2 ? C'est un deuxième activateur appartenant à la même super-famille : **AadR**.

L'induction des deux enzymes (ligase, réductase) est donc soumise à une double autorisation. Le facteur HbaR reconnaît la présence du substrat et AadR constate que les conditions sont anaérobies. Cette situation est typique du déclenchement des inductions par l'anaérobiose. Il est réalisé en présence du substrat (ce qui est logique) et dès que la présence nuisible de l'oxygène est écartée.

La dégradation réductrice anaérobie des benzoates hydroxylés n'est pas réservée au dérivé *para*. Le dérivé *méta* ou **3-hydroxybenzoate** est également attaqué par *Thauera aromatica*. Les bactéries développées sur ce substrat peuvent croître aussi sur benzoate, mais pas sur le dérivé *para*. Inversement les bactéries cultivées sur celui-ci n'attaquent pas le dérivé *méta*. Il y a donc induction d'enzymes distinctes dans les deux cas **[41]**. Ici encore le 3-hydroxybenzoate est couplé au coenzyme A par une ligase, puis réduit par une enzyme qui n'est autre que la benzoate réductase. La suite des opérations présente une différence importante avec le cas précédent, puisque le cycle est réduit avant déshydroxylation, pour former un diényl-CoA hydroxylé non aromatique. Cette section nous a donc montré que la réduction anaérobie de la fonction phénol contourne la difficulté de la réaction par l'emploi de systèmes sophistiqués adaptés à chaque cas.

11.5 - LES VOIES ANAÉROBIES DU BENZOYL-COENZYME A

Revenons au benzoate comme point de convergence dans la transformation de divers substrats aromatiques au cours de l'anaérobiose. Le plan directeur a été publié notamment par HARWOOD et GIBSON **[42]** et comporte quatre stades fondamentaux :

- une réduction du noyau aromatique ;
- une hydratation suivie d'une déshydrogénation ;
- l'ouverture du cycle ;
- une β-oxydation rappelant le métabolisme des acides gras et aboutissant à l'acétyl-coenzyme A.

La très grande importance de ce type de dégradation dans la nature vaut qu'on la détaille un peu.

La **benzoyl-CoA réductase**, qui catalyse comme on le sait la première opération, est la perle de tout le dispositif, parce que la réduction du noyau benzénique conduisant à sa désaromatisation n'est pas chose aisée. La réaction est considérée comme radicalaire (deux électrons apportés séparément l'un après l'autre). On a une idée de sa structure chez le dénitrifiant *Thauera aromatica* **[43]**. L'enzyme a une structure de type αβγδ, pour une masse totale de 170 kDa. On y observe plusieurs centres fer-soufre, une flavine et du zinc. Sa purification se conduit sous atmosphère sans oxygène parce que celui-ci l'inactive. Le réducteur naturel est une ferré-

doxine réduite dotée de 2 noyaux [4Fe-4S] à très bas potentiel (– 450 mV). Elle est remplaçable expérimentalement par du citrate de titane(III) ou du méthylviologène. L'enzyme a besoin d'ATP qu'elle hydrolyse en ADP et phosphate :

benzoyl-CoA + 2 Ti(III) + 2 ATP(Mg) $\rightarrow$ diényl-CoA cyclique + 2 Ti(IV) + 2 ADP + 2 P_i

Du benzoyl-CoA à l'acétyl-CoA

Le tableau réactionnel est valable pour *Thauera aromatica*, *Rhodopseudomonas palustris* et *Syntrophus gentianae*. Il est incomplet, car il existe des variantes. On peut observer les analogies avec une β-oxydation où l'acétyl-coenzyme A est aussi le produit final. La benzoyl-CoA réductase utilisatrice d'ATP n'est pas très spécifique puisqu'elle accepte de réduire des analogues, hydroxylés, aminés, fluorés ou méthylés du benzoyl-CoA (la réaction est plus lente), ainsi que l'hydroxylamine et l'azoture. L'enzyme dépourvue de substrat et mise en présence d'ATP hydrolyse celui-ci comme le ferait une ATPase qui serait inhibée par l'oxygène. En effet le couplage entre l'hydrolyse d'ATP et la réduction du substrat n'est pas obligatoire. Une molécule d'ATP devrait être hydrolysée pour chaque électron trans-mis. En fait le couplage semble déraper de temps en temps et provoque une consommation accrue d'ATP. Il en résulte un surcoût physiologique. La cellule pourrait être amenée à gaspiller son ATP en faisant tourner son hydrolyse à vide. D'où l'importance, une fois de plus, des mécanismes de régulation. Il convient de mettre hors circuit ou de bloquer la synthèse d'un système enzymatique lorsqu'en absence

de substrat ou en présence d'oxygène, il viendrait à dilapider l'ATP. Un problème similaire existait dans le cas de la nitrogénase.

Le diène engendré par la réduction du benzoyl-CoA peut évoluer dans deux directions (flèches noires en sens opposé). L'**hydratase** de *Thauera aromatica* a été purifiée **[44]**. L'autre voie, catalysée par une **déshydrogénase**, prépare la saturation complète du cycle carboné. Le métabolisme indiqué sur le schéma suivant comporte trois réactions : une réduction par déshydrogénase (**1**), une hydratation (**2**), suivie d'une déshydrogénation de la fonction alcool (**3**). Cet enchaînement est tout à fait habituel dans la nature, et remplace une double liaison par une fonction cétonique comme dans la très classique β-oxydation des acides gras. Les flèches en pointillé désignent les réactions incomplètement caractérisées. On pense que cette voie est connectée à la dégradation du cyclohexane carboxylate, étudiée chez *R. palustris* **[45]**.

Formation du 2-cétocyclohexane-1-carboxyl-CoA

Les troisième et quatrième parties de ce métabolisme conduisent à l'acétyl-CoA, après rupture du cycle et apparition de pimélyl-CoA comme intermédiaire [3]. Le passage à l'acétyl-CoA comme produit final ressemble là aussi à une β-oxydation. La succession de ces réactions au cours de la dénitrification ne fait pratiquement aucun doute, au moins chez *Thauera aromatica* **[46]**· La rupture du cycle s'effectue par une hydrolase.

L'ouverture du cycle par une hydrolase

3 - *Rappel de nomenclature usuelle des diacides aliphatiques. En ajoutant à chaque fois un carbone après l'acide oxalique (HOOC-COOH), acide malonique, succinique, glutarique, adipique, pimélique.*

Le coenzyme A intervient deux fois par thiolyse. Nous assistons donc à un retour au métabolisme intermédiaire, avec la production de trois molécules d'acétyl-CoA. Si nous examinons le bilan général, nous voyons que les transformations du benzoyl-CoA aboutissent finalement à 3 molécules d'acétyl-CoA. La respiration anaérobie sur nitrate fournira l'énergie nécessaire à la réduction initiale et prendra en charge le NADH produit par les oxydations successives. Ce schéma général est déduit des études faites aussi bien avec *Rhodopseudomonas* qu'avec *Thauera,* et pourrait s'appliquer à de nombreux cas d'anaérobiose étrangers à la photosynthèse ou à la dénitrification. Il a tout de même un caractère provisoire, car toutes les enzymes n'ont pas encore été totalement purifiées ni caractérisées **[47]**. Mais cette section nous a montré la grande importance de l'acide benzoïque comme carrefour métabolique dans un environnement anaérobie.

Du pimétyl-CoA à l'acétyl-CoA

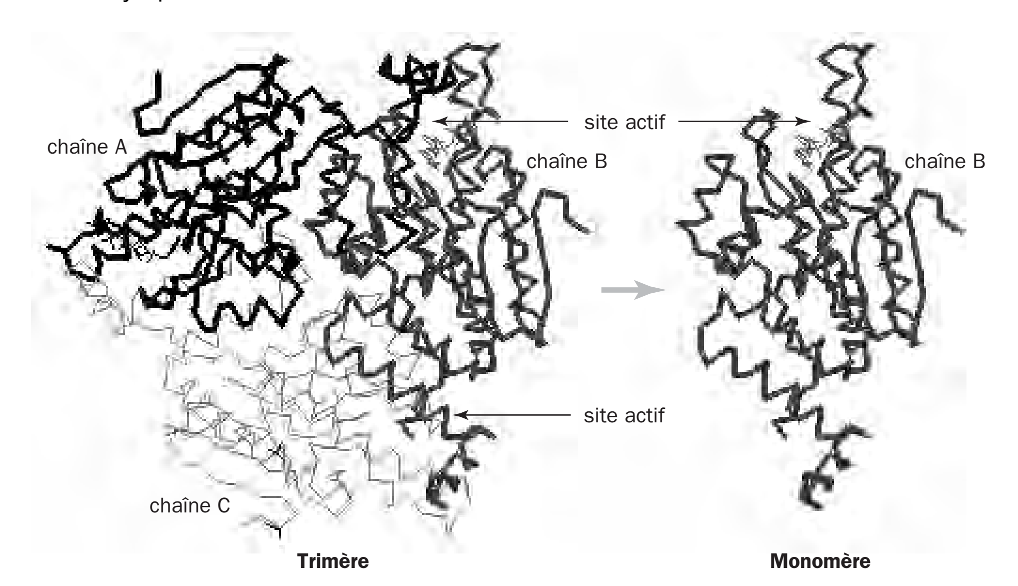
11.6 - Déshalogénations aérobies utilisant le coenzyme A

Les sections précédentes ont mis en lumière l'intervention du coenzyme A dans la destruction de substrats aromatiques, et les mécanismes décrits étaient surtout le fait d'organismes placés en anaérobiose et pratiquant la dénitrification. Il n'y a cependant aucune barrière tranchée avec l'aérobiose, et les mêmes outils sont parfois rencontrés en présence d'oxygène. L'attaque des aromatiques chlorés nous en apporte la preuve. Les chlorobenzoates apparaissent facilement au cours de la dégradation de substrats chlorés comme les PCB et se comportent éventuellement comme des produits récalcitrants. Nous savons à la suite d'un chapitre antérieur que leur métabolisme aérobie est fondé éventuellement sur l'action d'une halo-benzoate dioxygénase. Mais chose curieuse, les intermédiaires benzoïques tendent à être transformés plus facilement par les organismes dénitrifiants. Cette partie montrera qu'une déshalogénation peut fonctionner en aérobiose sans l'intervention

des oxygénases. Les modes utilisés sont le départ de l'halogène par hydrolyse ou par réduction, le coenzyme A étant à nouveau un acteur privilégié.

Dans le premier cas, une transformation aérobie du 4-chlorobenzoate (4CB) en 4-hydroxybenzoate (4HB) est pratiquée par un *Pseudomonas* CBS3. La substitution de l'atome de chlore par un hydroxyle s'effectue avec l'aide transitoire du coenzyme A. Ce mécanisme particulier comporte trois étapes :
- la synthèse du 4CB-CoA par une ligase ;
- l'intervention d'une déshalogénase par une réaction complexe ;
- une thiolyse séparant le produit (4HB) du coenzyme A **[48]**.

La **4-chlorobenzoyl-CoA déshalogénase** catalyse une opération chimiquement difficile. Elle s'explique plus facilement depuis que l'enzyme a été cristallisée à haute résolution en présence de 4HB-CoA. L'enzyme est un trimère de sous-unités identiques. Il y a trois sites catalytiques constitués par l'association des monomères deux à deux. La partie gauche du schéma représente la charpente du trimère, à l'exclusion des chaînes latérales d'acides aminés. La structure est riche en hélices α. Un monomère isolé est figuré à droite. On peut voir que chaque monomère possède deux prolongements qui contribuent chacun à la constitution d'un site catalytique tout en facilitant la cohésion du trimère.



4-Chlorobenzoyl-CoA déshalogénase

Les deux grandes étapes sont la formation d'une liaison covalente entre le substrat et l'enzyme, suivie d'une hydrolyse **[49]**. La première est une attaque nucléophile sur le substrat par le site catalytique (aspartate-145). L'intermédiaire fugace formé se réaromatise avec expulsion d'un ion chlorure et formation d'aryl-enzyme dont l'existence est confirmée par l'emploi de 4-hydroxybenzoyl-CoA marqué **[50]**.

Première réaction sur la déshalogénase

L'hydrolyse de l'intermédiaire covalent est alors facilitée par l'histidine-90 du site actif, en passant par un intermédiaire tétraèdrique qui est un état de transition représenté dans la formule entre crochets. L'atome d'oxygène de l'hydroxyle emporté par le cycle aromatique provient en majeure partie de l'eau.

Deuxième phase : l'hydrolyse

La catalyse est rendue possible par une organisation structurale très précise, où la pièce principale, l'aspartate-145, dirige son carboxyle en direction orthogonale par rapport au noyau aromatique du substrat, à un peu plus de 2 Å du carbone en *para*.

Le schéma simplifié montre la disposition du 4HB-CoA (le produit de la déshalogénation), la conformation repliée du coenzyme A, l'entourage de résidus essentiels (Asp-145, His-90), la présence de résidus hydrophobes autour du 4HB-CoA (leucine, phénylalanine, tryptophane). L'analyse structurale a montré que l'ensemble était verrouillé par un réseau de liaisons non-covalentes, notamment des liaisons hydrogène. La plus importante est entre Asp-145 et His-90.

Environnement du 4HB-CoA dans le site actif

L'étude de cette enzyme est un bon terrain d'exercice pour comprendre le mécanisme de la réaction. Mutations et modélisations par ordinateur permettent de s'en faire une idée. On voit par exemple que la deuxième phase, qui est une hydrolyse, utilise un cheminement des molécules d'eau jusqu'au cœur du site catalytique. L'aspartate-145, indispensable à la déshalogénation, intervient aussi dans cette phase d'hydrolyse en captant la molécule d'eau nécessaire avec une liaison hydrogène. La déchloration hydrolytique selon ce procédé se passe de l'intervention de l'oxygène et engendre un produit beaucoup plus facilement métabolisable, le 4-hydroxybenzoate. La déchloration peut aussi s'effectuer par réduction et c'est le deuxième procédé que nous avons envisagé.

Un *Corynebacterium sepedonicum* (KZ-4) a été isolé à l'origine comme pouvant se multiplier en aérobiose sur 4-chlorobenzoate (4CB) et 2,4-dichlorobenzoate (2,4DCB) comme seule source de carbone et d'énergie, mais les premiers stades du métabolisme n'avaient pas besoin d'oxygène. Une ligation par le coenzyme A est là encore nécessaire. Le 2,4DCB perd son chlore en ortho par une déshalogénase réductrice utilisant le NADPH comme source d'électrons **[51]**. La transformation du 2,4DCB par *C. sepedonicum* implique deux déshalogénations successives, réductrice puis hydrolytique. La voie proposée fait intervenir ensuite une mono-oxygénation et une dioxygénation. L'intermédiaire clé est l'acide protocatéchuique (encadré) dont la transformation est poursuivie par la voie du 3-oxoadipate ou voie *ortho*.

Déshalogénations et oxygénations

La souche étudiée est relativement spécifique du 4CB et du 24DCB. Elle utilise lentement le 2-chloro-4-fluorobenzoate et le benzoate lui-même, mais reste sans action sur le 4-fluorobenzoate et le 2-iodobenzoate. Les principales enzymes responsables sont inductibles. Nous voyons ici une réunion remarquable de plusieurs outils naturels dans la dégradation de substrats présumés récalcitrants. Ce principe a été observé dans *Alcaligenes denitrificans* et il est peut-être fort répandu **[52]**.

Nous allons observer ensuite une attaque anaérobie similaire des aromatiques halogénés ou méthylés aboutissant à des produits non toxiques pour l'environnement.

Une souche dénitrifiante appelée T1 est capable de se développer sur toluène, 4-hydroxybenzoate ou benzoate. On voudrait la voir croître aussi sur 4-chlorobenzoate. Or le passage de celui-ci au 4-hydroxybenzoate se fait par une déshalogénase, un complexe enzymatique qui enlève hydrolytiquement le chlore et le remplace par un hydroxyle. Ce système existe dans une souche de laboratoire, *Pseudomonas* CBS3, et n'a pas besoin d'O_2.
L'enlèvement d'un atome d'halogène sur une molécule organique, aliphatique ou aromatique, s'effectue toujours dans la nature sous forme d'anion halogénure (Cl^-, Br^-, I^-). Plusieurs stratégies existent dont les plus classiques sont récapitulées ainsi **[53]** :

- La déshalogénation dite par oxygénolyse a recours à une oxygénase. Elle a besoin d'oxygène moléculaire et sera laissée ici de côté.
- Une élimination par une déshydrohalogénase fait une double liaison après départ de HCl, en remplaçant > C(H)–C(Cl) < par > C=C < , mais intervient surtout sur des composés non aromatiques. Ce sera par exemple le cas du Lindane (chapitre 13).
- Une halidohydrolase catalyse une substitution qui remplace l'halogène par un hydroxyle (OH). Le mécanisme est généralement une hydrolyse, mais peut être plus complexe avec l'intervention de glutathion ou de substitutions intramoléculaires. C'est un mode de déshalogénation assez commun.
- Dans le cas particulier du chloroforme, de CH_3Cl et des halométhanes, le transfert d'un méthyle se fait sur le tétrahydrofolate (FH4) ou la tétrahydrométhanoptérine. Cette question a été examinée au chapitre 4 (pages 209, 222, 224). Ces réactions font intervenir des germes aérobies ou des méthanogènes.
- Une déshalogénation réductrice remplace l'halogène par un atome d'hydrogène. Elle est réalisée en général dans un cométabolisme ou par une respiration anaérobie où le dérivé halogéné sert d'accepteur d'électrons.

L'intervention de l'halidohydrolase concerne le 4-chlorobenzoate. Le laboratoire de YOUNG a cloné les gènes de cette déshalogénase et les a introduit dans l'espèce dénitrifiante T1 **[54]**. Les bactéries, transformées génétiquement et placées à l'abri d'O_2 en présence de nitrate, se sont mises à dégrader le 4-chlorobenzoate en même temps que le toluène et le 4-bromobenzoate. Les possibilités de traitement des substrats halogénés par dénitrification existent donc bien. Une recherche systématique de souches dénitrifiantes dans des sols et sédiments variés a montré que des associations bactériennes recyclaient assez facilement les trois benzoates monochlorés **[55]**. La dénitrification n'a pas l'exclusivité des diverses dégradations anaérobies, mais son excellent rendement énergétique comparé à celui d'autres modes anaérobies permet d'accélérer le processus comme il a déjà été remarqué. La palette des enzymes utilisées en anaérobiose est tout à fait distincte de l'arsenal des enzymes travaillant en présence de dioxygène et c'est toute une biochimie métabolique particulière qui apparaît. Dans les espèces anaérobies facultatives, O_2 est toujours l'accepteur d'électrons le plus avantageux et sert de signal régulateur pour déterminer quelles seront les protéines synthétisées et celles dont la synthèse sera mise en veilleuse. Nous savons que la

fonction essentielle des régulateurs tels que FNR est d'ouvrir ou de fermer les vannes en fonction du taux d'O_2.

La recherche systématique de souches aux potentialités nouvelles peut révéler des situations intéressantes. Certaines bactéries savent se développer sur 3-chlorobenzoate en milieu micro-aérobie (< 3 µM O_2), mais ne le font pas en anaérobiose complète. C'est le cas d'*Alcaligenes* L6, qui s'en sort apparemment par un métabolisme greffé sur le dioxygène même quand celui-ci est à très faible concentration. Par contre un phototrophe, *Rhodopseudomonas palustris* DCP3, peut jouer sur les deux tableaux, avec ou sans O_2. Dans le premier cas, la photosynthèse est arrêtée, et les bactéries peuvent tirer leur énergie d'oxydations ordinaires sur des substrats organiques comme le succinate. Le 3-chlorobenzoate n'est pas dégradé dans ces conditions. Il l'est par contre à la lumière et en présence d'oxygène pourvu que son taux soit assez faible pour rester compatible avec la photosynthèse. Le substrat n'est pas utilisé comme source d'énergie, sinon il serait attaqué par aérobiose. L'intervention nécessaire de la lumière montre que l'attaque du 3-chlorobenzoate a besoin d'énergie, peut-être pour l'activation avec coenzyme A en présence de ligase [**56**]. Cette dégradation est facilement évaluée par l'apparition des ions chlorure dans le milieu, mais le mécanisme reste malheureusement à analyser.

Les éléments décrits dans ce chapitre montrent la variété des procédés utilisés dans la nature pour traiter le métabolisme des aromatiques à l'abri de l'air. Les mêmes outils sont utilisés parfois en aérobiose conjointement aux oxygénases. Les organismes les plus performants en anaérobiose sont souvent des dénitrifiants obligés ou facultatifs. Leur dénombrement dans les sédiments et les rivières est encore très incomplet et l'étude microbiologique du problème est rendue difficile par l'existence de communautés bactériennes interactives dont les potentialités réelles sont brisées artificiellement par l'étude en culture pure.

CONCLUSION

La biodégradation des composés aromatiques s'effectue en anaérobiose par des procédés très différents de ceux des chapitres précédents, comme il fallait s'y attendre. On observe l'application de stratégies classiques du métabolisme courant comme la β-oxydation, le rôle du coenzyme A, la voie importante du benzoyl-succinate et divers modes de réduction. L'élimination des aromatiques halogénés est également possible en anaérobiose.

Références

[1] Seyfried B, Tschech A & Fuchs G (1991) *Archiv. Microbiol.* **155** : 249-255.

[2] Gold T (1992) The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89** : 6045-6049.

[3] Evans PJ, Ling W, Goldschmidt B, Ritter ER & Young LY (1992)
Appl. Environ. Microbiol. **58** : 496-501 ;
Seyfried B, Glod G, Schocher R, Tschech A & Zeyer J (1994)
Appl. Environ. Microbiol. **60** : 4047-4052 ;
Rabus R & Widdel F (1995) *Arch. Microbiol.* **163** : 96-103.

[4] Coschigano PW, Häggblom MM & Young LY (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 989-995.

[5] Seyfried B, Tschech A & Fuchs G (1993) *Arch. Microbiol.* **155** : 249-255 ;
Mohamed M el-S, Seyfried B, Tschech A & Fuchs G (1993) *Arch. Microbiol.* **159** : 563-573.

[6] Nozawa T & Maruyama Y (1988) *J. Bacteriol.* **170** : 5778-5784.

[7] Bossert ID & Young LY (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **52** : 1117-1122 ;
Bossert ID, Whited G, Gibson DT & Young LY (1989) *J. Bacteriol.* **171** : 2956-2962.

[8] Milhelcic JR & Luthy RG (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1188-1198.

[9] Harder J & Probian C (1995) *Appl. Environ. Microbiol*. **61** : 3804-3808.

[10] Dangel W, Tschech A & Fuchs G (1988) *Arch. Microbiol.* **150** : 358-362.

[11] Mohamed ME, Seyfried B, Tschech A, Fuchs G (1993) **159** : 563-573.

[12] Schneider S & Fuchs G (1998) *Arch. Microbiol.* **169** : 509-516.

[13] Kurtz LC, Saurabh S, Crane BR, Donald LJ, Duckworth H & Drysdale GR (1992)
Biochemistry **31** : 7899-7907.

[14] Coates JD, Chakraborty R, Lack JG, O'Connor SM, Cole KA, Bender KS & Achenbach LA
(2001) *Nature* **411** : 1039-1043.

[15] Rabus R & Widdel (1995) *Arch. Microbiol.* **163** : 96-103 ;
Ball HA, Johnson HA, Reinhard M & Spormann AM (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 5755-5761.

16] Altenschmidt U & Fuchs G (1991) *Arch. Microbiol.* **156** : 152-158.

17] Seyfried B, Glod G, Schocher R, Tschech A & Zeyer J. (1994)
Applied Environ. Microbiol. **60** : 4047-4052.

[18] Rudolphi A, Tschech A, Fuchs G (1991) *Arch. Microbiol.* **155** : 238-248.

[19] Bossert ID, Young LY (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **52** : 1117-1122 ;
Bossert ID, Whited G, Gibson DT, Young LY. (1989) *J. Bacteriol.* **171** : 2956-2962.

[20] Brackmann R & Fuchs G (1993) *Eur. J. Biochem.* **213** : 563-571 ;
El Kasmi A, Brackmann R, Fuchs G & Ragsdale SW (1995) *Biochemistry* **34** : 11668-11677 ;
Boll M, Fuchs G, Meier C, Trautwein A, El Kasmi A, Ragsdale SW, Buchanan G & Lowe DJ
(2001) *J. Biol. Chem*. **276** : 47853-47862.

[21] Coates JD, Chakraborty R, Lack JG, O'Connor SM, Cole KA, Bender KS & Achenbach LA
(2001) *Nature* **411** : 1039-1043.

[22] Coates JD, Chakraborty R & McInerney MJ (2002) *Res. Microbiol.* **153** : 621-628.

[23] KOCH J, EISENREICH W, BACHER A & FUCHS G (1993) *Eur. J. Biochem.* **211** : 649-661 ;
BOLL M & FUCH G (1995) *Eur. J. Biochem.* **234** : 921-933 ;
HARWOOD C & GIBSON J (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 301-309.

[24] GIBSON J, GEISSLER JF & HARWOOD CS (1990) *Methods Enzymol.* **188** : 154-159.

[25] WHITEHEAD DC (1964) *Nature* **202** : 417-418 ;
WHITEHEAD DC, DIBB H & HARTLEY RD (1982) *J. App. Ecol.* **19** : 579-588.

[26] EGLAND PG, GIBSON J & HARWOOD CS (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 6545-6551.

[27] ELDER DJE, MORGAN P & KELLY DJ (1992) *FEMS Microbiol. Lett.* **98** : 255-260.

[28] VILLEMUR R (1995) *Can. J. Microbiol.* **41** : 855-861.

[29] BUCKEL W & KEESE R (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34** : 1502-1506.

[30] ACHONG GR, RODRIGUEZ AM & SPORMANN AM (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 6763-6770.

[31] SEYFRIED B, GLOD G, SCHOCHER R, TSCHECH A & ZEYER J (1994)
Appl. Environ. Microbiol. **60** : 4047-4052 ;
BIEGERT T, FUCHS G & HEIDER J (1996) *Eur. J. Biochem.* **238** : 661-668 ;
LEUTWEIN C & HEIDER J (2002) *Arch. Microbiol.* **178** : 517-524.

[32] LEUTHNER B, LEUTWEIN C, SCHULTZ H, HÖRTH P, HAEHNEL W, SCHILTZ E, SCHÄGGER H, HEIDER J
(1998) *Molec. Microbiol.* **28** : 615-628 ;
BELLER HR & SPORMANN (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 5454-5457 ;
ACHONG GR, RODRIGUEZ AM & SPORMANN AM (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 6763-6770 ;
BELLER HR & EDWARDS EA (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 5503-5505.

[33] KRIEGER CJ, ROSEBOOM W, ALLBRACHT SPJ & SPORMANN AM (2001)
J. Biol. Chem. **276** : 12924-12927.

[34] WAGNER AFV, FREY M, NEUGEBAUER FA, SCHÄFER W & KNAPPE J (1992)
Proc. Natl. Acad. Sci. **89** : 996-1000.

[35] RIOS-HERNANDEZ LA, GIEG LM & SUFLITA JM (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 434-443.

[36] BAKKER G (1977) *FEMS Microbiol. Lett.* **1** : 103-108 ;
TSCHECH A & FUCHS G (1989) *Arch. Microbiol.* 148 : 594-599 ;
VAN SCHIE PM & YOUNG LY (1998) *Appl. Env. Microbiol.* **64** : 2432-2438.

[37] HE Z & WIEGEL J (1995) *Eur. J. Biochem.* **229** : 77-82 ;
HE Z & WIEGEL J (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 3539-3543.

[38] GIBSON J, DISPENSA M & HARWOOD CS (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 634-642.

[39] BOLL M, FUCHS G, TILLEY G, ARMSTRONG FA & LOWE DJ (2000) *Biochemistry* **39** : 4929-4938.

[40] EGLAND PG & HARWOOD CS (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 100-106.

[41] LAEMPE D, JAHN M, BREESE K, SCHÖGGER H & FUCHS G (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 968-979.

[42] HARWOOD CS& GIBSON J (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 301-309 ;
HARWOOD CS, BURCHHARDT G, HERRMANN H & FUCHS G (1999)
FEMS Microbiol. Rev. **22** : 439-458.

[43] BOLL M & FUCHS G (1995) *Eur. J. Biochem.* **234** : 921-933.

[44] BOLL M, LAEMPE D, EISENREICH W, BACHER A, MITTELBERGER T, HEINZE J & FUCHS G (2000)
J. Biol. Chem. **275** : 21889-21895.

[45] Hutber GN & Ribbons DW (1983) *J. Gen. Microbiol.* **129** : 2413-2420 ;
Küver J, Xu Y & Gibson J (1995) *Arch. Microbiol.* **164** : 337-345.

[46] Gallus C, Schink B (1994) *Microbiology* **140** : 409-416.

[47] Blakley ER (1978) Can. *J. Microbiol.* **24** : 847-855 ;
Härtel U, Eckel E, Koch J, Fuchs G, Linder D & Buckel W (1993) *Arch. Microbiol.* **159** : 174-181 ;
Perrotta JA & Harwood CS (1994) *Applied Environ. Microbiol.* **60** : 1775-1782 ;
Küver J, Xu Y & Gibson J (1995) déjà cités ;

[48] Löffler F, Lingens F & Müller R (1995) *Biodegradation* **6** : 203-212.

[49] Lau E & Bruice TC (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98** : 9527-9532.

[50] Yang G, Liang PH & Dunaway-Mariano D (1994) *Biochemistry* **33** 8527-31

[51] Romanov V & Hausinger RP (1996) *J. Baceriol.* **178** : 2656-2661.

[52] Van den Tweel WJJ, Kok JB & de Bont JAM (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 810-815.

[53] Fetzner S (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50** : 633-657.

[54] Coschigano PW, Häggblom MM & Young LY (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 989-995.

[55] Haggblom MM, Riviera MD & Young LY (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* **144** : 213-219.

[56] Krooneman J, Van den Ackker S, Pedro Gomes TM, Forney LJ & Gottschal JC (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 131-137.

CHAPITRE 12
ALIPHATIQUES ET ORGANOHALOGÉNÉS

Les cycles désignés comme aromatiques par les chimistes existent en nombre immense dans l'environnement, déversés massivement en majorité par les végétaux, mais aussi par les activités humaines. Les oxygénations du cycle le rendent plus fragile et sont généralement le prélude à l'attaque ultérieure. Dans ce chapitre sont examinées les transformations initiales des hydrocarbures simples comme le benzène, le toluène et le naphtalène, ainsi que la nature des enzymes responsables. L'attention se portera ensuite sur le catabolisme de quelques dérivés simples, hydroxylés, nitrés, chlorés ou fluorés.

12 – Aliphatiques et organohalogénés

Ce chapitre nous confirmera la puissance de la microflore bactérienne pour éliminer des hydrocarbures pétroliers ou des composés chlorés nés de l'industrie. En fait elle a su s'adapter à des polluants nouveaux à l'aide d'outils dont elle disposait déjà pour recycler des composés naturels. Nous quittons ici l'univers spécifique des aromatiques.

12.1 - Les tristes marées noires

Les hydrocarbures évoquent généralement des produits rébarbatifs pour les organismes vivants et l'on pense généralement aux produits pétroliers. Ils sont cependant courants en petite quantité dans la nature. Si on omet le méthane, ils proviennent parfois d'aldéhydes à longue chaîne décarbonylés par des algues marines à l'aide d'une enzyme à cobalt **[1]**. La cuticule des insectes et des plantes renferme des alcènes à masse moléculaire élevée comme protection contre la perte d'eau. Ils tirent leur origine de la décarboxylation d'acides gras insaturés ou de l'oxygénation d'aldéhydes avec élimination de CO_2, un procédé observé chez la mouche domestique **[2]**. Les isoprénoïdes, caroténoïdes et terpènes sont très répandus dans la nature et se rattachent à cette vaste famille.

La nature a toujours connu des épanchements de pétrole, mais en des localités précises et par petites quantités. Revenons sur le fait que les suintements d'hydrocarbures ont été remarqués depuis la plus haute antiquité. Par exemple dans les ruines de Suse, détruite par Assurbanipal en 640 av. J.C. on a retrouvé des objets antérieurs au premier millénaire av. J.C. et moulés en mastic de bitume mélangé à des débris végétaux, du sable et de la calcite. Ils sont exposés au musée du Louvre. Ces petits épanchements continuels n'ont rien à voir avec les pollutions de la vie moderne, dont les pires sont causées par des accidents maritimes à répétition. Le premier en date sur les côtes bretonnes a été celui du *Torrey Canyon* en mars 1967 avant la création en France d'un Ministère de l'Environnement (1971). Le naufrage de l'*Amocco Cadiz* le 16 mars 1978 a répandu à nouveau sur les côtes bretonnes quelques 220 000 tonnes de pétrole. Un autre accident majeur fut l'échouage de l'*Exxon Valdez* sur les côtes de l'Alaska, le 24 mars 1989, répandant dans une zone protégée au moins 37 000 tonnes de pétrole brut. Il a servi de terrain d'essai à une des plus grandes campagnes de nettoyage des dernières années, notamment pour une épuration biologique. Les dégâts sur la faune et la flore

du littoral ont été énormes, et il en a résulté une forte prise de conscience. Les moyens mécaniques habituels de collecte du polluant et de son élimination se sont avérés insuffisants ou trop lents, et l'on s'est efforcé de favoriser la multiplication de micro-organismes capables de solubiliser ou de dégrader complètement les hydrocarbures **[3]**. Pour cela ont été utilisées principalement deux catégories d'ingrédients, des fertilisants comme le Customblen [1], et l'Inipol EAP22, fabriqué par Elf Aquitaine et acheminé par avion. L'Inipol est un mélange de lauryl-phosphate, d'urée, d'un tensioactif (2-butoxyéthanol) et d'acide oléique. Les essais effectués sur le terrain et en laboratoire ont montré que ces fertilisants avaient un effet bénéfique, permettant d'accélérer le processus biologique et d'éliminer les hydrocarbures plus profondément dans les sols souillés que par les lavages mécaniques. Les pollutions les plus redoutables émanent des fiouls lourds, formant des goudrons et des gommes récalcitrants comme lors du naufrage de l'*Erika*, le 11 Décembre 1999 au sud du Finistère, ou encore celui du *Prestige* au large des côtes espagnoles à la fin de 2002 qui a été particulièrement catastrophique en venant souiller plus de 1000 km de littoral. Les composants les plus légers ont en effet une meilleure tendance à s'évaporer dans l'atmosphère. Ces affaires ont révélé des prises de risque particulièrement scandaleuses et montré du doigt les nombreux "navires poubelles" qui sillonnent les océans. Les accidents maritimes ne sont pas les seuls responsables de la souillure des mers car ils interviennent pour moins de 10% de la pollution par le pétrole, mais leur gravité vient du caractère massif des épandages et des effets dommageables spectaculaires sur l'environnement. Une grande partie de la pollution des mers vient du rinçage des cuves et du déversement des eaux de ballast effectué au mépris des règles internationales. D'autres pollutions mal contrôlées résultent des activités industrielles ou d'une mauvaise gestion des déchets.

Deux facteurs essentiels viennent limiter ou ralentir l'action des micro-organismes sur les hydrocarbures : leur faible solubilité dans l'eau et leurs effets toxiques sur les cellules vivantes. Dans le premier cas intervient un problème d'accessibilité. Les substrats hydrophobes ont tendance à former une phase distincte, et la faible vitesse de leur diffusion en milieu aqueux retarde leur biodégradation. Cet inconvénient est amoindri par dispersion en émulsion. Certains germes comme *Pseudomonas aeruginosa* émettent des agents mouillants (faisant office de détergent) qui accélèrent la vitesse du transfert en émulsionnant les hydrocarbures. Il en résulte une croissance plus rapide du germe qui peut se développer sur l'heptane comme seule source de carbone et d'énergie **[4]**. Le caractère lipophile des hydrocarbures est la principale source des effets toxiques en provoquant des altérations de la structure membranaire **[5]**. Les aliphatiques à courte chaîne et les aromatiques légers sont plus diffusibles et sont plus toxiques pour la faune et la flore que le pétrole lui-même. En conséquence l'essence ordinaire reste indemne de toute corruption par les micro-organismes, tandis que le fond des réservoirs de kérosène ou de gazole héberge volontiers des germes formant des émulsions et des gommes.

---

1 - Mélange de phosphate et nitrate d'ammonium, phosphate de calcium.

La découverte d'agents biologiques assimilateurs d'hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques est un tableau de chasse rassurant pour la bioremédiation des produits pétroliers, dont l'épuration biologique est en principe possible. Malheureusement on ne peut pas laisser les nettoyeurs naturels se débrouiller tout seuls, car leur action est souvent trop lente pour interdire les conséquences désastreuses que l'on sait sur la pêche, la faune, le tourisme, et l'on en passe. La pelle et le nettoyage mécanique sont encore nécessaires pour débarrasser les plages de cette pollution.

Nous avons eu l'occasion de mentionner l'existence de suintements naturels de produits pétroliers à partir des sédiments marins. La dispersion annuelle des hydrocarbures sur toute la surface des océans se chiffrerait par milliers de tonnes. Conclusion : les mers ont depuis fort longtemps l'habitude de cette pollution discrète. La vie s'y est donc préparée à loisir, et les organismes consommateurs d'hydrocarbures ont été sélectionnés bien avant l'arrivée des épandages d'origine humaine.

Dans un article de l'été 2002 du magazine scientifique *La Recherche*, L. LAUBIER et C. ALZIEU **[6]** se voulaient rassurants, en montrant la capacité de la mer, sous le climat breton, à effacer en moins de 10 ans les traces d'une marée noire. Citons : "*La marée noire est l'archétype de la pollution accidentelle, localisée et temporaire. Lorsqu'il est déversé, le pétrole est plus ou moins toxique en fonction des hydrocarbures aromatiques qu'il contient. Mais son vieillissement, sa dispersion et sa biodégradation font que, peu à peu, il n'a sur les peuplements qu'une action comparable à celle d'un excès de matière organique.*" On peut dire que toute contamination par des hydrocarbures est destinée à se résorber peu à peu, mais la lenteur des processus naturels, les dégâts considérables causés aussitôt à la flore et à la faune marines, à l'industrie touristique, à la sécurité sanitaire, font qu'en général on ne peut pas se permettre de laisser la pollution s'évacuer toute seule sans rien faire.

12.2 - BACTÉRIES ET LEVURES SUR ALIPHATIQUES

Quels sont les organismes capables d'oxyder les hydrocarbures aliphatiques ? Ce sont essentiellement des bactéries et diverses levures. Parmi les premières se rencontrent les inévitables *Pseudomonas*, des *Vibrio*, *Achromonas*, ainsi que des genres abondants dans les sols : *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*. On doit ajouter à ces exemples des espèces capables d'oxyder le méthane comme substrat de croissance essentiel. L'attaque des alcanes [2] et autres hydrocarbures n'est alors qu'une activité secondaire résultant d'un cométabolisme. Parmi les levures citons les genres *Candida*, *Hansenula*, *Torulopsis* (une quinzaine de genres sont concernés) **[7]**. La capacité des levures d'attaquer les hydrocarbures est connue depuis le XIXe siècle. Tout échantillon de sol renferme en abondance des

2 - Mot clé pour les bases de données : alkane (en anglais).

organismes capables de dégrader des hydrocarbures et il en est de même pour le milieu marin. À croire que ces "pétrolivores" sont des constituants banals du sol. Il n'y a rien d'étonnant à cela. En dehors des composés aromatiques communs en biochimie végétale existent à profusion des terpènes et des hydrocarbures saturés ou non, produits du métabolisme secondaire pour des fonctions d'excrétion, de défense ou de réserve carbonée. Qu'il nous suffise de penser au caoutchouc naturel, produit par *Hevea brasilensis*, et aux constituants trouvés dans le latex de nombreuses plantes. Les exemples sont nombreux. Le plus simple des alcènes, l'éthylène, est produit par les plantes supérieures comme hormone dans le mûrissement des fruits. Des alcènes à longue chaîne font partie de la cuticule des insectes et des plantes, servent de signaux de communication et de protection contre la dessicative. Les *caroténoïdes et les terpènes** forment une vaste famille apparentée à celle des hydrocarbures même si leurs molécules renferment parfois de l'oxygène (vitamine A).
On ne connaît pas de micro-organisme utilisateur de n'importe quel hydrocarbure dans n'importe quel milieu. Chaque espèce a des exigences spécifiques : longueur de chaîne, ramifications, insaturation. Dans leur diversité se dégagent quelques principes de base :

- L'attaque des hydrocarbures aliphatiques est surtout **aérobie** et débute par l'action d'une mono-oxygénase formant un alcool, qui est oxydé à son tour jusqu'au stade de l'acide. Il existe aussi une dégradation anaérobie, moins bien connue, qui s'observe chez certains sulfato-réducteurs et ne fonctionne bien que s'il y a au moins 6 atomes de carbone dans la molécule. Il en sera question dans la section suivante.

- Les hydrocarbures saturés à **chaîne droite** sont les plus exposés. Les chaînes ramifiées sont moins facilement attaquées, et leur caractère récalcitrant augmente avec le nombre de ramifications. Par contre les hydrocarbures ramifiés sont plus susceptibles aux oxydations photochimiques non-enzymatiques et à la présence de radicaux libres.

- Les alcanes à **longue chaîne** sont plus facilement assimilés que les composés à chaîne courte. L'optimum est dans la gamme entre C_{10} et C_{18}, aussi bien chez des *Pseudomonas* que chez les levures *Candida*. Les alcanes plus courts que C_9 sont oxydés facilement mais plus rarement assimilés.

- Les **effets toxiques** des hydrocarbures à courte chaîne s'expliquent par leur plus grande solubilité dans l'eau et la désorganisation des lipides membranaires. Les meilleurs résultats en culture expérimentale sur *n*-hexane sont obtenus par petites additions successives de substrat ou par son apport en phase vapeur. L'utilisation des alcanes à courte chaîne (butane, pentane) est commune dans un groupe de Gram-positifs : *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*.

- La non-miscibilité des hydrocarbures dans l'eau se traduit par un *log Koc** élevé. Leur biodégradation dépend énormément de leur **état physique** (émulsion, adsorption, dispersion micellaire), et de l'état des cellules, selon qu'elles sont dispersées, logées dans un biofilm ou adhérentes à un substrat.

- La dégradation du pétrole brut, qui contient à la fois des alcanes et des aromatiques, peut s'effectuer à l'aide de communautés bactériennes organisées en dépôts ou en biofilms, où se rencontrent des cyanobactéries, mélangées à un cocktail d'espèces comme *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* et divers champignons **[8]** : une mise en commun des ressources biologiques pour dégrader un met peu appétissant !

La dispersion des hydrocarbures dans l'eau par agitation crée des microglobules en suspension qui se recouvrent de bactéries, de levures et de champignons et forment des floculats. Les dégradeurs les plus performants, bactéries ou levures, mobilisent les molécules de substrat par des agents tensioactifs assez étonnants. Par exemple *Pseudomonas aeruginosa* fait en abondance un **émulsifiant** constitué d'un rhamnolipide et d'une protéine activatrice **[9]**. Les bactéries ont besoin de ce rhamnolipide pour assimiler l'hexadécane **[10]**. Il existe plusieurs solutions pour "mouiller" les hydrocarbures. *Bacillus licheniformis* se sert d'acides gras en C_{16} - C_{18}, et de lipopeptides contenant des acides gras hydroxylés en C_{14} - C_{15} attachés à des chaînons peptidiques de 7 acides aminés en majorité hydrophobes **[11]**. Ces produits sont des tensioactifs puissants et fond d'une pierre deux coups, car ils ont en même temps une action antibiotique contre d'autres espèces. Un *Acinetobacter* utilise une stratégie à peine différente et englobe l'hydrocarbure dans de minuscules vésicules (20-50 nm) entourées par une membrane de composition similaire à celle de la membrane cellulaire externe par ses phospholipides, lipopolysaccharides et protéines. On suppose que la coalescence des vésicules avec la surface cellulaire facilite l'internalisation du contenu **[12]**.

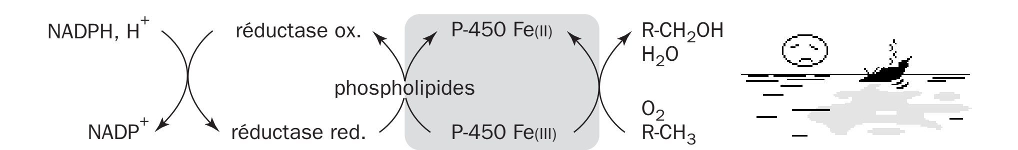
De nombreuses biotechnologies ont été proposées pour décontaminer les lieux souillés par des hydrocarbures ou traiter les réservoirs. On fait souvent appel à des injections d'air ou d'oxygène. Le triéthylphosphate est utilisé comme source de phosphore, car il est suffisamment volatil pour être entraîné par les gaz injectés dans le sol. Les micro-organismes le scindent en libérant le phosphate. Chaque cas nécessite une technique particulière. Hélas, en ce qui concerne la pollution des plages par les goudrons de l'*Erika* et du *Prestige*, les procédés les plus rapides étaient encore la pelle et la petite cuillère !

Quel est le principe de la dégradation aérobie des aliphatiques ? La voie la plus commune est l'oxydation d'un méthyle terminal selon un principe très simple. Une mono-oxygénase y introduit un atome d'oxygène et engendre un alcool, qui est ensuite oxydé en aldéhyde puis en acide gras. Il y a trois indications expérimentales : un peu d'acide ayant la même chaîne carbonée que le substrat initial apparaît dans le milieu, et l'on peut isoler un ester entre l'acide et l'alcool correspondants. D'autre part l'oxygène-18 apporté par O_2 enrichi en cet isotope est bien introduit dans l'acide. Enfin la mono-oxygénase a pu être isolée et purifiée à partir de plusieurs sources.

Le métabolisme de l'acide gras se fait par le mécanisme classique appelé ***β*-oxydation***. Ce procédé auquel il a déjà été fait allusion a été mis en évidence depuis plus de quarante ans dans les mitochondries, les bactéries, les levures et champignons filamenteux. Une deuxième oxydation à l'autre bout de la chaîne, ou ω-oxydation, conduit éventuellement à un diacide.

CH_3
n-alcane
O_2, NAD(P)H
CH_2OH
CHO
COOH
acide gras
β-oxydation
CH_2
O
C
O
ester

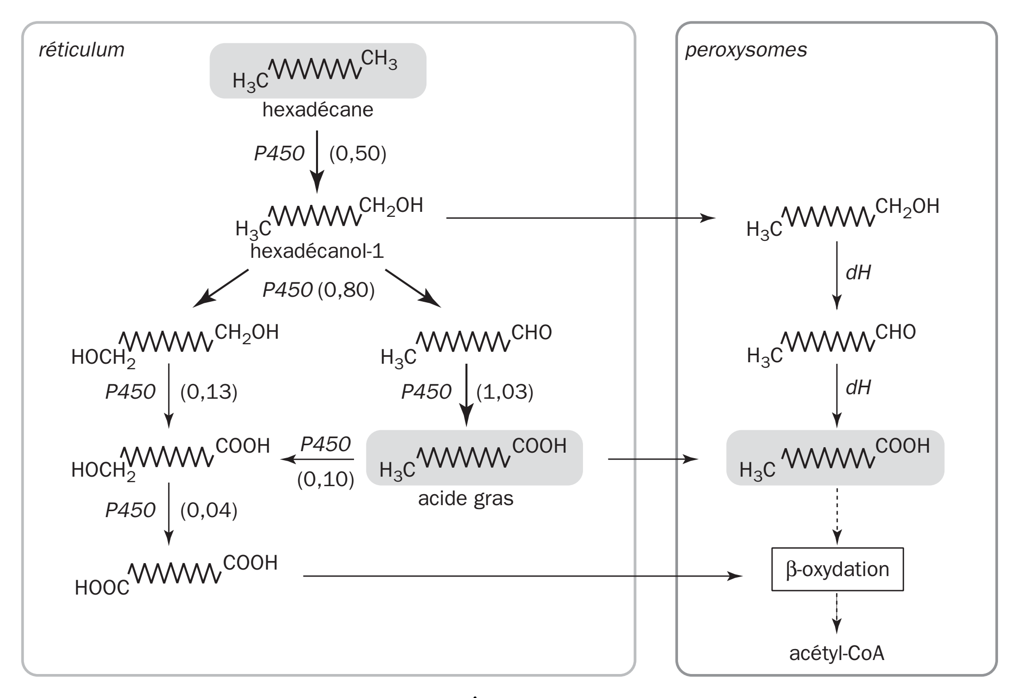
Les **levures** les plus étudiées pour l'attaque des alcanes sont *Candida tropicalis* et *C. maltosa*. Le tétradécane et les hydrocarbures plus longs induisent la machinerie, l'hydroxylase et les deux déshydrogénases nécessaires **[13]**. L'outil principal est une batterie de **cytochromes P450** membranaires localisés dans les microsomes et non pas dans les peroxysomes **[14]**. Ils ont besoin d'une source d'électrons (NADPH). Aussi travaillent-ils en association avec une réductase flavinique. Les cytochromes P450 sont des protéines étonnantes, dont nous retrouverons plus loin les caractéristiques essentielles avec le cytochrome P450 bactérien lié à l'oxydation du camphre (section 5). Le schéma de base du fonctionnement d'un P450 membranaire associé à sa réductase est :



Ces P450 ne font-ils que transformer un alcane en alcool primaire ? D'après une étude portant sur *Candida maltosa,* la réponse est non. L'une de ces protéines a été purifiée, puis associée in vitro avec sa réductase et utilisée sur hexadécane [**15**]. Le dessin suivant montre les différentes molécules obtenues à partir de l'hexadécane linéaire. Le rapport V_{max}/K_m est donné entre parenthèse pour donner une idée de l'efficacité relative de l'enzyme sur les différentes réactions [3]. Les phases les plus actives sont notées par une flèche épaissie. D'autres réactions ont lieu dans les *peroxysomes** et n'utilisent pas de P450. Elles s'effectuent par déshydrogénation (dH).

Les cellules de levure induites à dégrader les hydrocarbures subissent un certain nombre de modifications au niveau de leur arsenal enzymatique, dans leurs peroxysomes et à leur surface **[16]**. Elles adhèrent aux gouttelettes de substrat et les absorbent sous forme d'inclusions à l'aide d'agents de transport.

3 - *Vmax est la vitesse maxima (µmoles par minute). Les vitesses sont relativement lentes, car les substrats sont peu solubles et la vitesse de diffusion vers le site catalytique est probablement limitante.*



Oxydation de l'hexadécane chez Candida maltosa

La prolifération des peroxysomes dans les cellules leur apporte un concentré d'enzymes consacrées au métabolisme lipidique [4], les membranes intracellulaires augmentent leur surface pour héberger un plus grand nombre de molécules d'hydroxylase **[17]**. Il en résulte tout un remue-ménage cellulaire et plusieurs enzymes apparaissent sous des formes multiples légèrement différentes les unes des autres (iso-enzymes) **[18]**.

Ce sujet est le prétexte d'évoquer une question de fond concernant les biodégradations. La levure est déjà une cellule très compliquée, avec noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, peroxysomes, soit autant de compartiments communiquant entre eux à travers des barrières membranaires. Se nourrir d'alcanes consiste à utiliser des ressources carbonées très déséquilibrées pour articuler entre eux les différents chemins métaboliques. Par exemple les voies de transformation et de synthèse des acides gras doivent maintenir une balance avec celles du *mévalonate**. La levure doit aussi refaire des sucres et des acides aminés. La confection des isoenzymes catalysant toutes les mêmes réactions est une réponse au problème, chacune d'elles étant optimisée pour fonctionner dans une voie donnée et dans un compartiment cellulaire donné. En outre les substrats de croissance forment un mélange complexe d'hydrocarbures qui ne sont pas tous aussi facilement hydroxylables. C'est sans doute pour cela que *Candida maltosa* fabrique une multiplicité de cytochromes P450 adaptés individuellement à une gamme de

4 - *Pour les lecteurs familiers de ces questions : catalase, acyL-CoA oxydase, acetyltransférase, acetoacétyL-CoA thiolase, 3-cétoacyL-CoA, carnitine, isocitrate lyase, thiolase, malate synthase.*

substrats **[19]**. Par exemple un P450 donné fonctionnera mieux sur tétradécane, un autre sur hexadécane.

Aux difficultés posées par l'hétérogénéité des hydrocarbures se dresse celle des ramifications de chaîne. Le pouvoir des levures est généralement très sensible à l'existence des branchements, notamment vers l'extrémité de la chaîne dite *ante-iso* **[20]**. D'autres organismes fongiques contribuent à dégrader les hydrocarbures ainsi que des bactéries. Certains champignons filamenteux tels que *Cladosporium resinae* sont susceptibles d'attaquer les produits pétroliers à leur interface avec l'eau, et leur développement est gênant dans les réservoirs de carburant pour moteur Diesel ou pour l'aviation. Il est même surprenant de constater à quel point diverses espèces peuvent contaminer le kérosène, rendant nécessaire le nettoyage des carburants pour les avions. Ce problème est bien moindre pour l'essence automobile, qui s'avère plus toxique pour les micro-organismes.

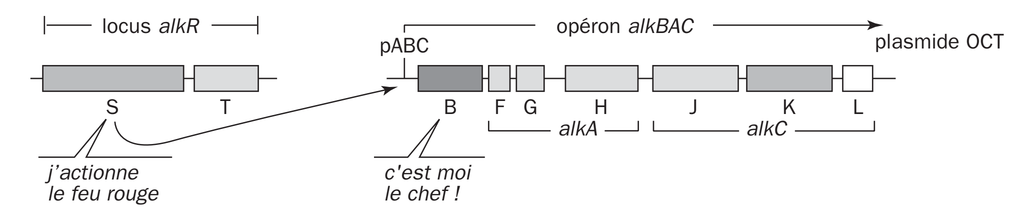
On se rappelle sans doute que des projets ont été mis en œuvre il y a plus d'une quarantaine d'années pour produire industriellement des protéines consommables en cultivant des levures sur produits pétroliers. Des usines ont été construites à la Jamaïque et ailleurs, en France à Lavera dans le golfe de Fos. On escomptait une production de quelques 16000 tonnes de protéines par an. Une insuffisance des débouchés commerciaux et le premier choc pétrolier de 1973 ont entraîné l'arrêt de cette expérience industrielle.

12.3 - L'INTERVENTION DES BACTÉRIES

Le système bactérien le plus étudié depuis les années soixante est celui d'une espèce mésophile, *Pseudomonas oleovorans*, représentative d'une série de germes actifs sur les alcanes. Le mode d'action ressemble à celui de la section précédente, mais les outils sont différents. L'hydroxylase terminale de *P. oleovorans* fonctionne comme une mono-oxygénase mais n'est pas un P450. La synthèse de cette protéine ou AlkB est induite expérimentalement par les alcanes ou par un inducteur gratuit (dicyclopropylcétone). AlkB peut représenter jusqu'à 1,5 - 2% des protéines totales, ce taux étant fortement accru si le gène est transplanté et induit dans un colibacille. La protéine s'accumule alors dans des proportions extravagantes, s'élevant à 10 - 15% des protéines totales de la bactérie, qui en est affaiblie et subit un retard de croissance. Ceci nous donne l'occasion de citer un détail important. L'hydroxylase AlkB est une protéine membranaire intrinsèque. Pour loger une aussi grande quantité de AlkB, la bactérie accroît la surface des membranes susceptibles de l'héberger, et développe en quantité des replis internes de cette membrane dont la composition est légèrement modifiée **[21]**. L'enzyme n'est pas héminique. Elle active l'oxygène par un noyau bi-métallique contenant du fer, un dispositif déjà vu dans la dégradation des composés aromatiques **[22]**. On connaît au moins 66 protéines membranaires dont le site catalytique renferme deux ions Fe placés l'un au voisinage de l'autre. Ce sont des hydroxylases et désaturases.

Elles font partie d'une même grande famille regroupant aussi quelques protéines solubles [5].

L'oxygénase AlkB est associée à d'autres facteurs codés par un ensemble de gènes groupés en deux opérons **[23]**. Ces gènes sont portés par un élément extra-chromosomique, le **plasmide OCT**. Les deux parties sont *alkR* et l'opéron *alkBAC* (où A et C correspondent chacun à trois gènes, et R à deux gènes). Pour mieux réaliser la participation de chacun, voici une carte génomique succincte et un tableau :



Alk	***kDa***	***Fonction***
S	99	Régulatrice, agit sur le promoteur pABC et l'active en présence d'inducteur **[24]**
T	48	Rubrédoxine réductase : récupère les électrons du NADH
B	41	**Mono-oxygénase** membranaire : active O_2 et oxyde le substrat aliphatique
F	15	Rubrédoxine : ne serait pas essentielle au fonctionnement de l'hydroxylase
G	19	Rubrédoxine : transporte les électrons de AlkT vers AlkB
H	49	Déshydrogénase : oxyde les aldéhydes aliphatiques en l'acide correspondant
J	58	Déshydrogénase membranaire : oxyde en aldéhyde les alcools à chaîne moyenne
K	59	Ligase, synthétise un acyl-coenzyme A en scindant l'ATP (→ AMP + PPi)
L	20	Installée dans la membrane, pourrait être un transporteur

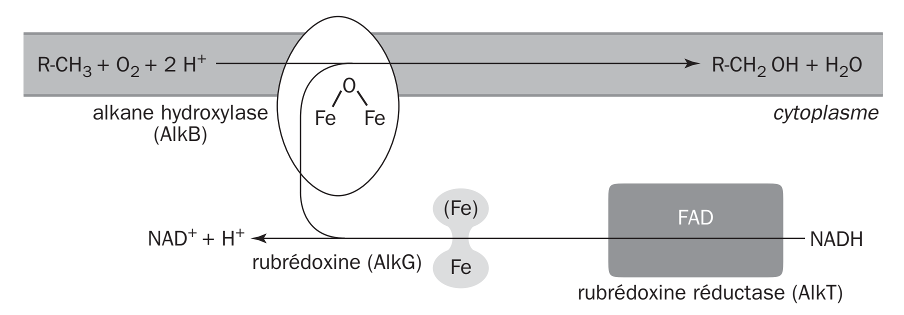
Les gènes alk

Nous retrouvons le principe de base des mono-oxygénases : une source d'électrons oxydée par une réductase (**AlkT**) qui transmet les éléments réducteurs à l'oxygénase (**AlkB**) par l'intermédiaire d'une *rubrédoxine**, une petite protéine faisant office de ferrédoxine, mais dépourvue de soufre acido-labile. La réductase alkT est soluble et a fait l'objet d'études physico-chimiques détaillées **[25]**. Il y a deux rubrédoxines interchangeables, AlkF et AlkG. Le croquis est imité de Staijen et coll. (2000).

L'hydroxylase AlkB est longue de 401 acides aminés et traverse plusieurs fois la membrane à laquelle elle est solidement ancrée. Elle oxyde surtout des chaînes courtes de 6 à 12 atomes de C, mais certaines souches préfèrent des substrats plus longs (jusqu'à 20 atomes de C).

---

5 - *Les protéines à noyau bi-métallique aperçues à propos des aromatiques sont des protéines solubles formant une autre famille. Ici les séquences ont un motif caractéristique comprenant huit fois l'histidine : HxxxHxxx...HxxxHHx...HxxxHH. La présence du noyau bi-métallique dans l'alcane hydroxylase est déduite des études en spectrométrie MÖSSBAUER, et on peut penser que toutes les protéines ayant le motif à 8 His ont aussi un tel centre bi-métallique. Il y aurait donc deux grandes familles d'oxygénases renfermant 2 Fe, regroupant des enzymes solubles comme celle du toluène, et des enzymes membranaires où l'environnement du métal est différent.*



L'alcane hydroxylase membranaire du plasmide OCT

Les différences sont dues en partie au métabolisme des acides gras en aval, où la longueur de chaîne a communément des effets différentiels marqués sur l'activité des enzymes. AlkH et AlkJ contribuent à l'apparition d'un acide gras récupéré sous forme d'acyl-CoA. La liaison thioester avec le coenzyme A est la condition *sine qua non* pour que l'acide gras soit métabolisé, en l'occurrence dans une β-oxydation. La fonction de AlkL n'est pas connue. Elle a peut-être un rôle purement stabilisateur pour maintenir l'association des différents partenaires sur la membrane. Tous les gènes cités sont sur le plasmide OCT. Chose curieuse, le chromosome bactérien possède aussi des gènes qui participent au métabolisme des alcanes, *alcA* (alcool déshydrogénase), et *alcD* (aldéhyde déshydrogénase).

L'expression de l'opéron *alkBAC* (*alkBFGHJKL*) exige un gène *alkS* fonctionnel, même lorsque l'ensemble est transporté et exprimé dans une autre espèce. Le gène *alkS* a un effet *trans*. Son produit est une protéine activatrice au niveau du promoteur de l'opéron *alk*. Elle autorise la phase critique du démarrage de la transcription par l'ARN-polymérase **[26]**, sur le principe habituel des activateurs bactériens mais avec une condition supplémentaire. L'expression de l'opéron *alk* est soumise à une répression catabolique : lorsque le milieu de croissance contient une source carbonée plus favorable comme le glucose ou le glycérol, *P. oleovorans* ne perd pas son temps à fabriquer les enzymes Alk et consomme la dite source en priorité. Le mécanisme surajouté à l'activation par AlkS n'est pas connu avec certitude, mais le fonctionnement de la répression catabolique est bien documenté chez *Escherichia coli*, où il dépend de la *protéine CRP**. Ce double contrôle n'est pas une clé universelle. On s'en est rendu compte en clonant les gènes *alk* dans un plasmide qui colonise aussi bien le colibacille que le *Pseudomonas*. Le colibacille induit les gènes *alk* et les exprime vigoureusement même lorsque le milieu contient du glucose **[27]**. Ceci n'est pas surprenant *a priori*. Le colibacille renferme le plasmide en exemplaires multiples et possède comme toutes les espèces ses propres circuits régulateurs. Dans *P. oleovorans*, l'attaque des alcanes est contrôlée de façon assez compliquée, parce que les gènes incriminés sont répartis à la fois sur le plasmide et le chromosome, et obéissent à des signaux distincts.

Quelle est l'origine des gènes *alk* ? Elle reste mystérieuse, mais on peut penser qu'ils ont été transmis à partir d'une espèce différente. Un indice est le pourcentage de 47%, en bases G + C de l'ADN *alk*, nettement inférieur à celui du *Pseudomonas*. Les gènes auraient été recombinés accidentellement au plasmide dont la

propagation aurait fourni un avantage sélectif. Il est possible que de tels transferts génétiques horizontaux aient lieu dans la microflore à la suite des marées noires. L'emploi de sondes nucléiques représentant *alkB* (pour les aliphatiques) et *xylE* (pour les aromatiques) a montré que les populations bactériennes avaient acquis ces gènes en différentes proportions qui étaient influencées par la composition en hydrocarbures de la pollution initiale.

La destruction des alcanes dans des sédiments pose un problème délicat quand il s'agit d'une pollution par du kérosène, de l'essence ou du gazole. Les contaminants ont dans tous les cas de très nombreux constituants à chaîne droite ou ramifiée, mélangés à des aromatiques. On ne peut plus se contenter des cultures pures s'attaquant à un substrat défini. Cette question a été étudiée notamment par l'Institut Français du Pétrole **[28]**. La méthodologie de base utilisait des mélanges synthétiques mis en présence d'échantillons de boues prélevés dans l'environnement, et l'on mesurait la quantité de CO_2 produite par oxydation. Les tests étaient conduits sur milieu minéral supplémenté par un mélange d'hydrocarbures en fioles fermées hermétiquement. Les fioles étaient agitées à 30° pendant une période d'un mois, au cours de laquelle la disparition des hydrocarbures individuels était suivie par chromatographie gazeuse. Les bactéries de l'environnement sont apparues comme ayant une capacité surprenante à dégrader la gamme étendue des hydrocarbures présents dans les produits pétroliers courants. Leur efficacité variait cependant avec la nature du produit. La dégradation des alcanes ramifiés, comme les 2,2,3- et 2,3,4-triméthylpentanes, restait incomplète et le cyclohexane s'est montré relativement récalcitrant.

La contamination des régions froides par des carburants pour Diesel et des huiles lourdes pose un problème difficile, car les basses températures des régions arctiques tendent à solidifier ces éléments et retardent l'acclimatation de la microflore. La croissance biologique y est très lente. Des auteurs ont isolé en zone arctique une souche psychrotrophe de *Rhodococcus* (Q15), qui est susceptible de dégrader les hydrocarbures pour Diesel, comprenant des *n*-alcanes (C10-C21), des éléments ramifiés et du cyclohexane substitué **[29]**. Une dégradation étendue pour les premiers était quasi totale à 5°C au bout de 28 jours en présence d'extrait de levure. D'autres constituants étaient également détruits, mais plus lentement. C'est un exemple supplémentaire des potentialités très riches des bactéries du genre *Rhodococcus.* Elles commencent l'attaque des chaînes d'hydrocarbures par une oxydation terminale ou subterminale. Un alcool primaire est formé dans le premier cas, un alcool secondaire puis une cétone dans le second. On s'intéresse actuellement très vivement aux alcane hydroxylases multiples trouvées dans certaines espèces de bactéries Gram-positives et chez Rhodococcus **[30]**, et on s'est rendu compte finalement que ces enzymes sont communes dans la nature. Il resterait évidemment à pouvoir les exploiter.

Un *Mycobacterium* (IFP 2173) utilise l'iso-octane (2,2,4-triméthylpentane) comme seule source de carbone et d'énergie, **[31]**.Cette souche dégrade tous les *n*-alcanes de 5 à 16 atomes de carbone, ainsi que les 2-méthyl-alcanes ayant 5 à 8 atomes de carbone dans leur chaîne principale. Cette souche utilise également un certain nombre de di- et triméthyl-alcanes, ainsi que le toluène, les *m*- et *p*-xylènes. Chose

curieuse, les bactéries ignorent certains substrats comme le cyclohexane et l'éthylbenzène quand ils sont présents isolément, mais les transforment quand ils sont en mélange avec d'autres hydrocarbures. La cyclohexanone est alors un produit du cyclohexane et résulte d'un cométabolisme, comme il se dégage des résultats de SOLANO-SERENA et coll. Bien que toxiques par rapport aux homologues supérieurs, des hydrocarbures variés à courte chaîne sont attaqués. Le procédé par lequel les alcanes méthylés sont métabolisés reste hypothétique. En principe, une ramification ne peut que gêner les voies les plus répandues comme celle de la β-oxydation.

Un mécanisme considéré comme probable serait la carboxylation des groupes méthyle conduisant à un acétyle, qui serait ensuite éliminé avec ablation de la ramification latérale.

Carboxylation d'un méthyle

Plusieurs espèces capables de se développer sur le **propylène** et d'autres alcènes aliphatiques à courte chaîne ont donné lieu à des observations surprenantes. L'un de ces germes est un Gram-négatif, *Xanthobacter* Py2. Un autre est un Gram-positif, *Rhodococcus rhodocrous*. Le métabolisme commence par une mono-oxygénation qui donne un **époxyde** en logeant un atome d'oxygène sur la double liaison. La transformation ultérieure fait intervenir le coenzyme M (CoM), alors que ce cofacteur est un attribut normal des méthanogènes. Un schéma en représente le mécanisme. Une mono-oxygénation (**1**) produit deux énantiomères *R* et *S*, avant intervention d'une époxy-alcane-CoM transférase (**2**), d'une déshydrogénation (**3**), et d'une carboxylation par une oxydoréductase/carboxylase (**4**) qui régénère le coenzyme M **[32]**. L'acétoacétate alimente le métabolisme intermédiaire.

Dégradation du propène

La synthèse du coenzyme M et celle des enzymes du métabolisme des alcènes et des époxydes sont régulées de façon parallèle, suggérant l'existence d'un contrôle commun. Or on a pu démontrer que les gènes étaient portés par un **mégaplasmide** linéaire de 320 kb chez *Xanthobacter* et de 185 kb chez *Rhodococcus*. Ces éléments sont requis pour la croissance sur propylène, et renferment des séquences fortement homologues de certaines structures génétiques des méthanogènes **[33]**.

On ne retrouve pas cette homologie chez d'autres espèces bactériennes. L'emploi du CoM chez les eubactéries à la place d'un cofacteur plus conventionnel reste mystérieux. L'importation d'information génétique en provenance d'archaebactéries est probable. Elle n'est peut-être pas exceptionnelle. Il a été observé récemment chez des eubactéries la présence du coenzyme M et d'autres cofacteurs appartenant typiquement aux méthanogènes : le MPTH4 et la déazaflavine (F420) **[34]**. Des homologies intéressantes ont été trouvées chez *Bacillus subtilis* avec des gènes archaebactériens impliqués dans la synthèse du coenzyme M. Le *L*-sulfolactate en serait un intermédiaire. Ce produit est trouvé en grande quantité, soit 5% et plus du poids sec, dans les cellules en cours de sporulation et dans les spores **[35]**. On ne sait pas pourquoi les spores accumulent ce produit qui est absent des cellules végétatives, et d'où vient ce lien avec les méthanogènes. Les spécialistes s'attendent à trouver de plus en plus souvent des cas de ce genre. La frontière biochimique entre eubactéries et archaebactéries serait donc beaucoup moins étanche que primitivement escompté. Nous voyons en conclusion que la biodégradation des hydrocarbures aliphatiques, qui paraissait basée au départ sur des principes assez simples, révèle des connexions étranges qui remontent sans doute aux âges les plus lointains.

12.4 - ALICYCLIQUES ET TERPÈNES

Les hydrocarbures comportant une chaîne saturée fermée sont appelés alicycliques. Le **cyclohexane** est l'un des plus simples et pose des problèmes environnementaux car il est utilisé en grande quantité comme solvant pour les dérivés de la cellulose, les laques, résines et cires. Il est précurseur de l'acide adipique utilisé dans l'industrie du Nylon. L'effet pervers d'une contamination par le cyclohexane vient en partie de sa toxicité sur la microflore. Les molécules du solvant s'intercalent dans les membranes et les désorganisent. Si la toxicité de ces molécules est liée à leur hydrophobicité, elle dépend aussi de leur structure moléculaire. Par exemple le *n*-hexane est mieux toléré que le cyclohexane par *E. coli,* le modèle bactérien par excellence. Des auteurs y ont mis en évidence une porine (protéine de la membrane externe) formant un canal destiné à faciliter l'expulsion des molécules hydrophobes vers l'extérieur **[36]**. La porine **TolC** participerait à un pompage s'appuyant sur un autre facteur, **AcrAB**, un des agents de la résistance multiple aux antibiotiques et substances toxiques [6]. Le système AcrAB/TolC est un dispositif de défense allant d'une membrane à l'autre et permet l'évacuation du cyclohexane considéré comme antibiotique.

La résistance au cyclohexane est emblématique d'une situation fréquente dans la nature, lorsqu'un micro-organisme confronté à la transformation d'un agent extérieur doit commencer par résister à son action toxique. Il y a deux façons de se défendre, soit rejeter le substrat à l'extérieur de façon à ce que sa concentration

---

6 - *Les bactéries se défendent de l'intrusion de substanes étrangères nocives, en particulier des antibiotiques, par des pompes peu spécifiques permettant leur expulsion (voir Résistance multiple*).*

dans la cellule reste faible, soit le dégrader rapidement au fur et à mesure, ce qui correspond à une détoxification. Le système de défense est soumis à régulation. Sa mise en route par l'expression des gènes concernés est une réponse à un état de stress. Il existe chez le colibacille plusieurs gènes de stress pour le déclencher (*stress**) **[37]**. L'un d'eux est *marA*, qui commande un vaste régulon de nombreux gènes. Ces réactions de stress sont peu spécifiques, et font qu'une agression par un solvant comme le cyclohexane va déclencher du même coup une résistance accrue aux antibiotiques hydrophobes.

Le cyclohexane est-il vraiment récalcitrant ? Les bactéries aérobies capables d'hydroxyler le cyclohexane et autres substrats alicycliques sont répandues dans l'environnement. En règle générale, les transformations se font par cométabolisme dans des populations mixtes. L'isolement des souches compétentes a souvent échoué faute d'utiliser la source carbonée auxiliaire appropriée. La mono-oxygénation transforme le cyclohexane en cyclohexanol, dont les transformations ultérieures sont assez bien connues. Le cyclohexanol est transformé en cétone, servant à son tour de substrat à la **cyclohexanone-1,2-mono-oxygénase**.

Dégradation du cyclohexanol

On voit qu'il y a insertion d'un atome d'oxygène dans le cycle, opération qui rappelle la réaction de *BAEYER-VILLIGER**. Cette enzyme a un fonctionnement peu courant. On attendrait une hydroxylation, alors qu'il y a lactonisation en ε-caprolactone. L'enzyme est flavinique, ressemble à la 4-hydroxybenzoate hydroxylase et son mécanisme a fait l'objet d'une étude détaillée **[38]**.

On rattache au cyclohexane et hydrocarbures analogues des composés cycliques ou non, saturés ou détenteurs d'une ou plusieurs doubles liaisons. La variété de ces produits dans l'environnement est considérable, qu'ils soient fabriqués par l'industrie ou qu'ils émanent de source biologique. Les **terpènes** forment une vaste extension de cette famille. Certains terpènes ont un cycle. Ils peuvent être des hydrocarbures *stricto sensu*, tandis que d'autres ont des fonctions oxygénées.

La principale source de terpènes dans la nature vient du monde végétal, en particulier des arbres. On a estimé que près de 480 millions de tonnes de terpènes étaient émises par an dans l'atmosphère **[39]**. La part prise par l'action photochimique avec l'aide des oxydes d'azote et celle de l'oxygène est importante. Hydrocarbures alicycliques et terpènes sont réunis ici parce qu'ils posent des problèmes de biodégradation tout à fait comparables.

Voici quelques exemples de monoterpènes simples [7]. On peut voir que ce groupe renferme aussi des aromatiques comme le *p*-cymène.

OH OH OH
(-)-β-citronellol géraniol nérol

H OH O
R(+)-limonène (-)-menthol γ-terpinène α-terpinène *p*-cymène eucalyptol

Le (+)-(4*R*)-limonène est l'un des terpènes les plus répandus, fabriqué par plusieurs centaines d'espèces de plantes, présent dans les essences de citron, de bergamote, d'aiguille de pin… Il a des propriétés insecticides. On s'en sert pour la synthèse de résines adhésives, d'arômes (menthol, carvone). Il existe dans la nature au moins 5 voies de biodégradation du limonène, qui dépendent chacune d'une **limonène mono-oxygénase** [8]. Un petit tableau indique dans quelles espèces bactériennes ou fongiques elles ont été trouvées.

limonène
7 6 1,2 3 8
CH_2OH HO O OH OH
I II III IV V

7 - mono-ox. *Pseudomonas putida, Ps. gladioli, Penicillium digitatum, Arxula adeninivorans*
6 - mono-ox. *Pseudomonas sp., Aspergillus cellulosae*
1,2 - mono-ox. *Rhodococcus erythropolis, Pseudomonas sp.*
3 - mono-ox. *Hormonema sp., Aspergillus cellulosae*
8 - mono-ox. *Pseudomonas gladioli, Penicillium digitatum*

Mono-oxygénation du limonène

---

7 - *Tous ces composés viennent de la diversification prodigieuse d'un métabolisme qui part de l'acétyL-CoA, passe par l'acétoacétyL-CoA, le mévalonyL-CoA, puis assemble des unités en C5 pour donner des poly-isoprénoïdes. C'est la base de la synthèse du cholestérol, des stéroïdes, des caroténoïdes, de la chaîne latérale des ubiquinones, du caoutchouc naturel, d'hydrocarbures fabriqués par les plantes et les animaux, et d'une grande partie des terpènes et dérivés.*

8 - *Les produits formés sont l'alcool périllylique(I), le trans-carvéol(II), le (4R)-limonène-1,2-époxyde(III), l'isopériténol(IV) et l'alpha-terpinéol.*

Les dérivés oxygénés sont dégradés par plusieurs voies et les intermédiaires peuvent être repris par d'autres organismes formant une chaîne ramifiée de transformations. Le métabolisme complet n'est pas connu, mais l'oxygénation en 7 du limonène donne une idée des réactions initiales.

(7-mono-oxygénase)
CH_2OH CHO COOH
acide périllylique
deux déshydrogénations
HSCoA HSCoA
β-oxydation

Dégradation du limonène

Une succession réactionnelle analogue à la β-oxydation s'observe fréquemment dans l'ouverture des cycles et aboutit à des acyl-CoA. D'autre part un vaste ensemble de conversions transforment les terpènes dans la nature, que ce soit par l'action des plantes ou des micro-organismes. La mono-oxygénation du limonène en 6, donnant le *trans*-carvéol, est suivie d'une déshydrogénation à l'origine de la carvone, un principe essentiel de la menthe verte. Une chimie extraordinaire et variée se déroule sous nos yeux, et engendre parfois des substances médicinales ou des parfums !

12.5 - LE CYTOCHROME P450 DU CAMPHRE

Le camphre est un terpène du camphrier (*Laurus camphora*). Le pinène, le camphène et le bornéol en sont des dérivés. Le camphre est devenu célèbre dans les études de biodégradation à cause de la découverte d'une souche de *Pseudomonas putida* capable de le dégrader, la première étape étant catalysée par un cytochrome P450.

Les cytochromes P450 forment une vaste famille d'enzymes héminiques qui ont toutes en commun de catalyser des réactions d'oxydation utilisant l'oxygène de l'air. Les plus communes sont les hydroxylations ou mono-oxygénations du métabolisme cellulaire normal (acides gras, stéroïdes) au cours de la détoxification de substances étrangères. On les rencontre partout, des bactéries aux plantes et aux animaux. Ceux de notre foie sont nécessaires à notre survie, car ils transforment les substances toxiques venant de l'alimentation et les médicaments, facilitant leur élimination sous forme de produits moins insolubles.

Le tableau ci-après en résume les propriétés les plus caractéristiques.

Propriété	
Solubilité	Hydrosolubles chez les procaryotes (65 kDa environ), membranaires ailleurs
Cofacteur	Hème B ; cinquième coordinence du fer occupée par un thiolate (cystéine)
Site actif	Du côté de la sixième coordinence, occupée au repos par des molécules d'eau
Source d'e^-	NAD(P)H, par l'intermédiaire d'une réductase et d'une ferrédoxine (ou d'un cyt.)
Mécanisme	Cycle déclenché par le substrat , réduction du fer ; l'O_2 se lie en 6e coordinence
Spectre	À l'état réduit bande d'absorption caractéristique à 450 nm en présence de CO
Spin	État bas spin au repos, haut spin en présence du substrat avec signal spectral
Catalyse	Oxygénations et diverses réactions secondaires : désaturations, désalkylations…
Spécificité	Généralement élargie à une gamme plus ou moins étendue de substrats

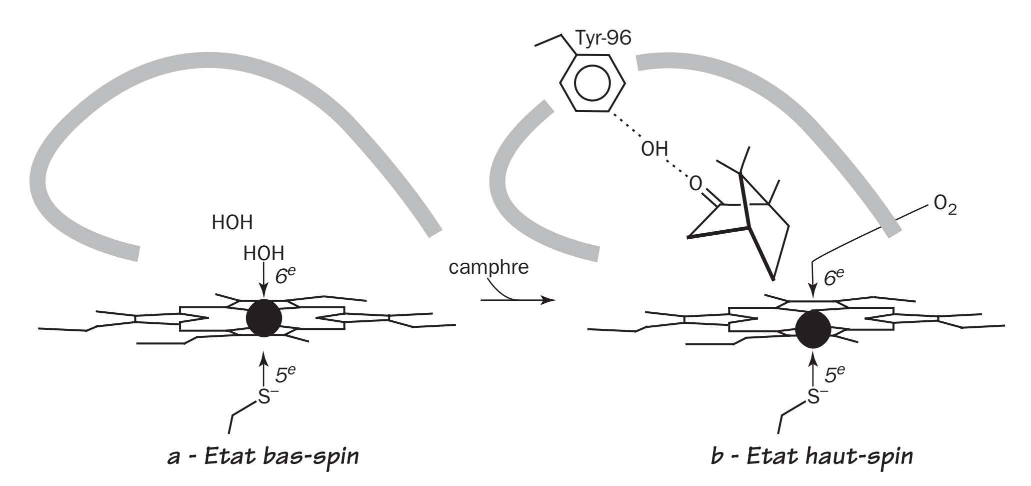
L'archétype des cytochromes P450 bactériens est tiré de *Pseudomonas putida* porteur du plasmide CAM. Il attaque le (1*R*)-camphre (ou *D*-camphre) et permet de mieux comprendre le cycle catalytique de ces enzymes **[40]**. Le cytochrome P450 du camphre (ou $P450_{CAM}$) est soluble, sa structure détaillée est connue. Quant au camphre, il est représentatif de nombreux terpènes naturels et entre dans maintes préparations pharmaceutiques ou autres applications, par exemple comme agent plastifiant. Ce sera ici l'occasion d'observer l'attaque par hydroxylation d'un carbone méthylénique ($–CH_2–$).

Un cytochrome P450 n'utilise pas directement NADH ou NADPH comme source d'électrons, il ne le fait que par une mini-chaîne de transporteurs, ici une réductase et une ferrédoxine à noyaux [2Fe-2S] appelée putidarédoxine. Seuls certains P450 du métabolisme secondaire des végétaux peuvent se passer de tels intermédiaires. La catalyse par P450 obéit à un plan de marche rigoureux. La protéine est conçue pour privilégier la liaison du substrat par rapport à la vitesse du cycle catalytique, peut-être ici pour permettre une fixation efficace du camphre, même lorsque celui-ci est présent dans l'environnement à un taux très faible. Cette opération est réglée coopérativement par les ions potassium **[41]**.

NADPH, H^+ — FAD — $[2Fe\text{-}2S]^+$ — Fe(III) — 5-exo-hydroxycamphre, H_2O
réductase — *putidarédoxine* — *P450*
$NADP^+$ — $FADH_2$ — $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ — Fe(II) — O_2, camphre

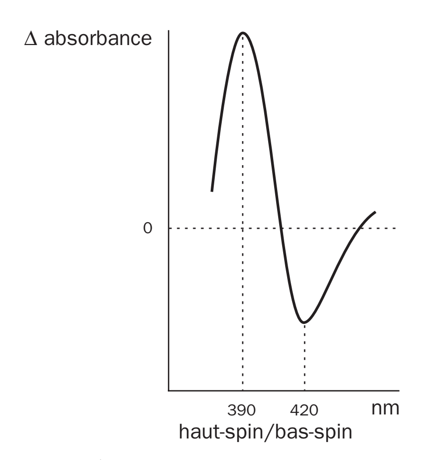
Oxygénation du camphre

Le substrat commence par s'installer dans la poche du site actif qui s'ouvre au niveau de la sixième coordinence comme symbolisé par le schéma qui suit.



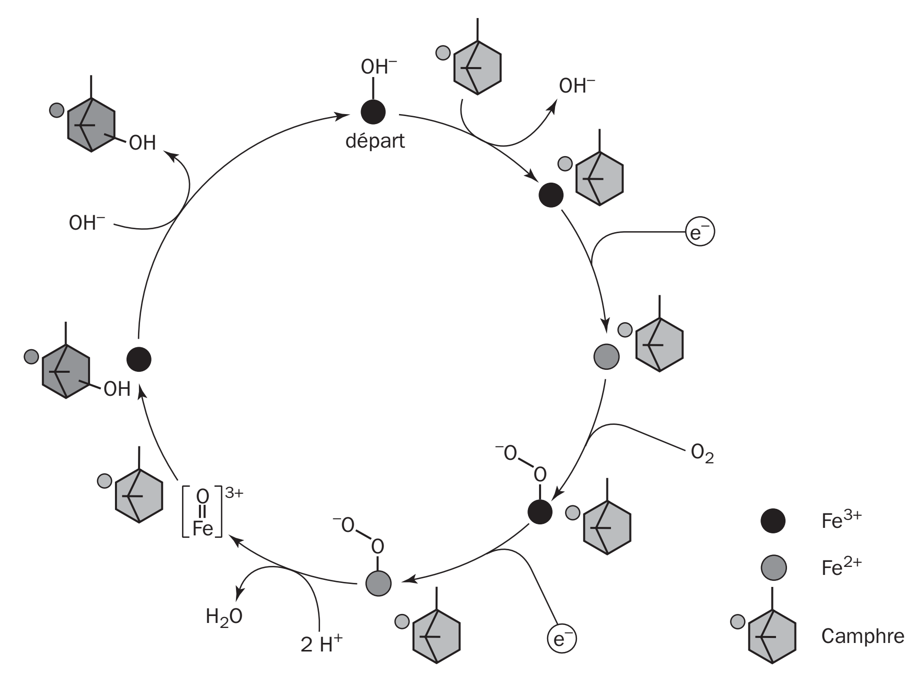
Oxydation du camphre

Le fer est la boule noire dans la porphyrine vue par la tranche. En ***a***, le fer établit 4 coordinences au sein de la porphyrine, une cinquième avec un atome de soufre et la sixième avec une molécule d'eau. La poche où s'installera le substrat est tapissée de motifs hydrophobes. En ***b***, le substrat expulse les molécules d'eau et s'oriente convenablement dans le site à l'aide d'un lien hydrogène entre son atome d'oxygène et un résidu de tyrosine de la cavité. La sixième coordinence reste libre et c'est l'oxygène diatomique qui viendra l'occuper. L'arrivée du substrat est l'étape initiale essentielle en dégageant la place où se fixera O_2. Tant que la sixième position reste libre, la géométrie de coordination du fer est asymétrique et le métal est à l'état haut spin. L'arrivée de l'oxygène restaure cette symétrie et le fer passe alors à l'état bas spin. Cette alternance entre les deux états se traduit par une modification spectrale.La perturbation induite par le substrat déclenche un petit remaniement structural de la protéine avec léger déplacement du fer perpendiculairement au plan de l'hème. Le passage de bas spin à haut spin se traduit alors par un signal en RPE, un déplacement du spectre optique et l'apparition d'une bande à 380 nm.



Spectre différentiel P450 + camphre / P450

Puisque le substrat ne se lie donc pas directement au fer mais à son voisinage immédiat, la stratégie utilisée consiste à réduire le métal par une source extérieure pour qu'il puisse lier O_2. Une fois en place, l'oxygène va être transformé en une entité très oxydante qui s'en prendra au substrat placé à son contact. En somme l'hème a pour action d'exacerber la réactivité de l'oxygène, non pas celle du substrat. Le cycle catalytique est résumé par un diagramme **[42]**.



Cycle du P450 du camphre

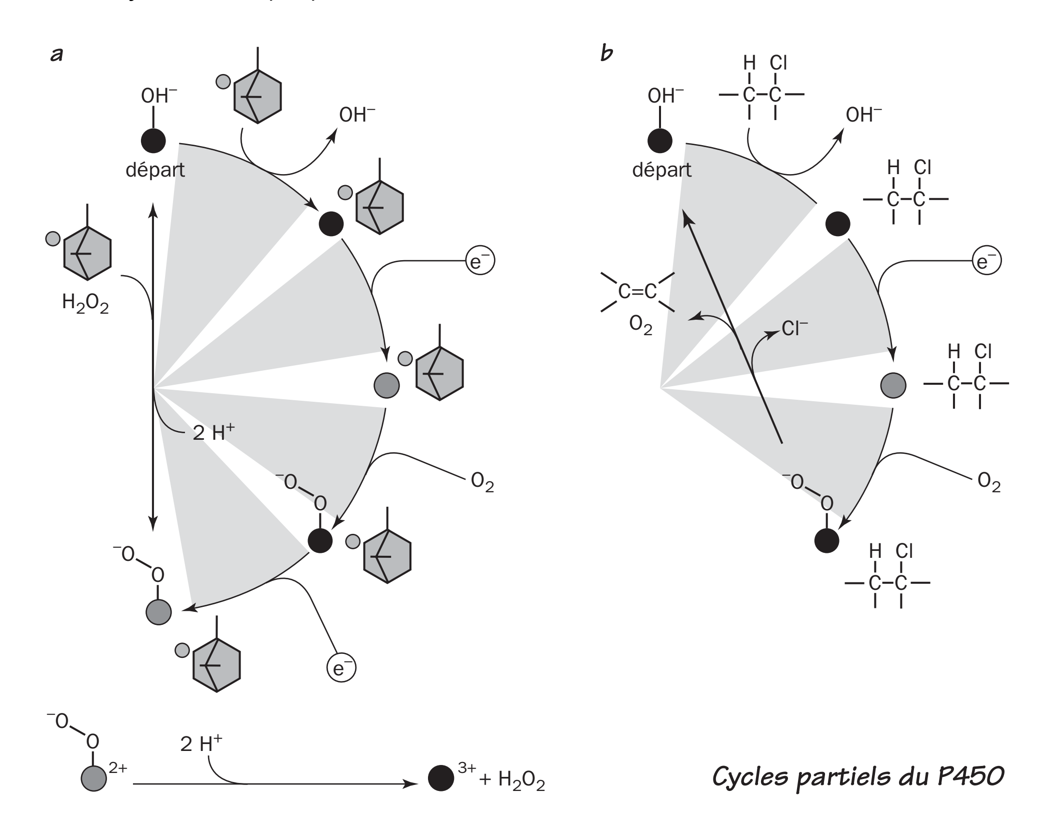
Il se produit un changement notoire du potentiel redox du fer, qui passe de – 300 mV à – 173 mV. La venue du camphre facilite donc la réduction ultérieure du métal. Le passage du fer de l'état Fe^{3+} à l'état Fe^{2+} permet l'arrivée de l'oxygène à la sixième coordinence comme déjà indiqué. Le spectre figuré ci-contre est la différence d'absorbance de la préparation contenant le cytochrome P450 et le substrat, et celle de la même préparation sans substrat. L'installation du camphre dans le site se traduit donc par un signal facile à détecter, sans qu'il y ait apport d'électrons ni réaction d'oxygénation. La protéine est donc facile à doser en l'absence de réductase et de putidarédoxine, simplement en mesurant l'amplitude de ce phénomène. Un signal inverse et un renforcement de l'état bas spin s'observent en présence de certains inhibiteurs (métyrapone) quand ils déplacent l'eau et se lient directement au fer.

On retrouve les faits suivants :

- l'arrivée du substrat rompt la sixième coordinence (départ d'une molécule d'eau ou d'un ion hydroxyle) ;
- le fer est réduit en Fe^{2+} par un seul électron ;

- la venue de l'oxygène sur le fer oxyde à nouveau celui-ci et passe à l'état d'ion superoxyde (O–O⁻) ;
- La liaison entre les deux atomes d'oxygène est rompue (coupure dite hétérolytique) et le fer est transformé en oxène (Fe=O), une entité extrêmement oxydante ;
- le cycle est complété par l'hydroxylation proprement dite. Le substrat n'est donc transformé qu'à la fin du cycle.

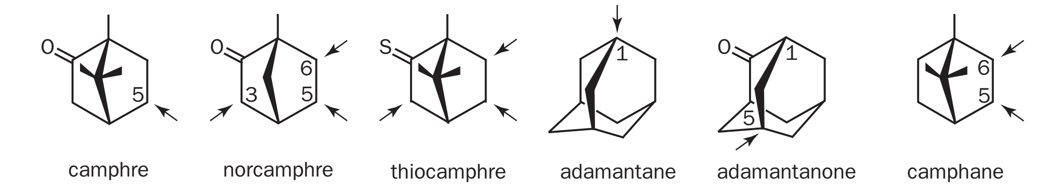
Le cycle complet consomme deux électrons, c'est-à-dire un NADH par molécule substrat hydroxylé. Le dosage enzymatique de l'hydroxylation du camphre par un système complet (avec réductase et putidarédoxine) est donc très simple, car il consiste à mesurer la disparition de l'absorbance du NADH à 340 nm. Le couplage entre oxydation de NADH et hydroxylation est alors de 100%. Ce rapport peut-il être altéré ? En principe, oui. On remarque que le substrat ne réagit qu'à la fin du cycle. En cas d'interruption, par exemple lorsque l'hydroxylation ne peut être réalisée, il y a un découplage partiel et un excès d'oxydation de NADH par rapport au substrat transformé. À la limite, il peut n'y avoir aucune hydroxylation et le système se met à fonctionner comme une vulgaire NADH oxydase. Voici par exemple comment le cycle peut s'interrompre. Le dessin montre le cycle tronqué du P450, en utilisant le même symbolisme que précédemment.



Cycles partiels du P450

En *a*, un analogue du substrat ne peut pas se faire hydroxyler, le mécanisme dérape en ne produisant que du peroxyde d'hydrogène à la manière d'une oxydase classique. Le cycle commence normalement, récupère O_2 et les deux électrons successifs, mais avorte au stade peroxy en émettant H_2O_2. L'enzyme fonctionne alors comme une **NADH oxydase,** avec consommation d'oxygène et production d'eau oxygénée. Mais le système peut fonctionner aussi dans l'autre sens (avec une efficacité réduite) : l'enzyme à son stade de départ peut fixer H_2O_2 et donner directement l'intermédiaire peroxy, qui évolue par la suite du cycle normal en oxydant le substrat. Le P450 agit alors comme une peroxydase. Ce type de découplage se produit assez souvent avec de nombreuses mono-oxygénases, surtout avec des analogues. L'activité peroxydasique du P450 du camphre reste cependant des plus modestes, mais donne lieu à des situations intéressantes. Ainsi l'enzyme hydroxyle un peu le naphtalène avec H_2O_2 par un détournement d'activité assez curieux. Cette propriété a été le point de départ d'une recherche créatrice d'un grand nombre de mutants par une variante de la technique PCR **[43]**. L'hydroxylation du naphtalène donne facilement des produits fluorescents faciles à détecter, et permet de sélectionner des mutants dont le P450 a été modifié. On espère obtenir ainsi des enzymes œuvrant facilement comme peroxydases sur des hydrocarbures et divers polluants.

Le cycle *b* du schéma est plus facilement observé à faible taux d'O_2. Le cytochrome P450 est porteur de superoxyde et fonctionne comme réducteur sur certains substrats. Le cycle normal avorte à ce stade, mais le substrat est éventuellement transformé. On peut assister à une déshalogénation dont nous verrons plus loin un exemple. Le P450 du camphre est donc une excellente molécule-laboratoire pour étudier les relations entre protéine et substrat, car on peut cristalliser l'enzyme en présence de différents ligands et observer la position de celui-ci dans le site actif **[44]**. Les formules ci-dessous désignent plusieurs ligands utilisés. Les petites flèches indiquent les positions hydroxylées.



Les critères utilisés sont l'état de spin, la position hydroxylée sur le substrat, le potentiel redox du fer, le nombre de coordinences de celui-ci (5 ou 6) et le *facteur de température**. Chose curieuse, l'attaque du camphre par le $P450_{CAM}$ n'est pas rigoureusement stéréosélective. L'enzyme hydroxyle aussi le (1S)-camphre **[45]**, qui se place avec deux orientations différentes, une seule étant favorable à l'hydroxylation en 5. Il en a résulté une mine de renseignements sur cette enzyme.

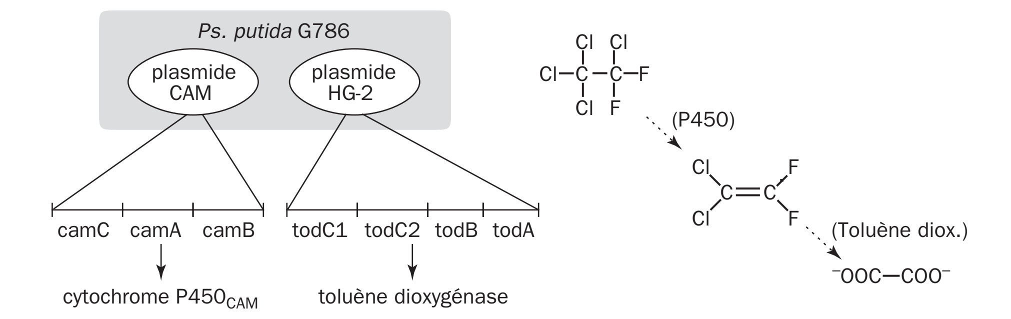
Un ligand est positionné par une liaison hydrogène avec la tyrosine du site (Tyr-96), ainsi que par des forces de VAN DER WAALS. Quand un ligand ne remplit pas tout l'espace ou n'établit pas de pont H, sa mobilité accrue a pour effet de faciliter l'hydroxylation en des points surnuméraires (norcamphre, camphane). Pour vérifier

cela ont été utilisées des mutations du P450 où Tyr-96 était remplacée par la phénylalanine, ce qui modifiait peu la géométrie du site mais supprimait le pont H, confirmant l'importance de celui-ci. La spécificité était élargie, le déplacement vers l'état haut spin était moins marqué (la sixième coordinence avec l'eau n'étant pas abolie). En outre le facteur de température (un paramètre cristallographique) était plus élevé que pour le camphre, traduisant un positionnement moins précis dans le site actif. Le thiocamphre s'installait avec plusieurs orientations et l'hydroxylation avait lieu en 3, 5 et 6. L'adamantane et l'adamantanone étaient hydroxylés à une seule position, un carbone tertiaire (dont la réactivité est plus grande **[46]**). Enfin quelques ligands offerts à l'enzyme comme des substrats imparfaits par rapport au camphre (thiocamphre, norcamphre et camphane) provoquaient un certain découplage entre la consommation de NADH et le taux d'hydroxylation par le système complet : il fallait environ deux fois plus de NADH que nécessaire, montrant que le cycle catalytique avortait une fois sur deux en moyenne comme il a été expliqué antérieurement. De façon générale si l'attachement d'analogues de substrat par le P450 revêt un caractère de plus en plus acrobatique, l'importance de ce découplage s'accroît d'autant. Le taux d'hydroxylation devient alors faible et l'enzyme se met à fonctionner de façon prédominante comme une oxydase ordinaire **[47]**.

Le système d'oxydation du camphre comprend la réductase, la putidarédoxine et le P450 et fonctionne comme une seule unité. Les gènes forment un opéron *camDCAB* dont l'expression est sous la dépendance d'un répresseur codé par *camR*. Le répresseur bloque la transcription de l'opéron par l'ARN-polymérase, mais cesse de le faire en présence d'un inducteur qui est le camphre ou un analogue. Le répresseur CamR régule sa propre expression. L'opéron renferme les gènes de la réductase (CamA, 422 acides aminés), de la putidarédoxine (CamB, 106 acides aminés), du P450 (CamC) et de la déshydrogénase qui opère en aval sur le produit d'hydroxylation du camphre (CamD). Ces protéines fonctionnent probablement en étroite association. On en a la certitude pour l'association putidarédoxine-P450. Quand le camphre entre dans le cytochrome P450, l'état haut spin qui en résulte s'accompagne d'un petit changement de conformation perçu par la putidarédoxine, qui en subit une modification structurale **[48]**. L'arrivée du camphre déclenche à l'unisson des changements mutuels qui ont pour effet de modifier les deux potentiels redox et d'abaisser la barrière énergétique liée à l'oxydoréduction entre les deux protéines en d'améliorant la rapidité du transfert. Nous avons déjà évoqué ce principe à propos des cytochromes respiratoires.

D'autres cytochromes P450 solubles comparables à celui du camphre ont été isolés. Le $P450_{TERP}$ isolé chez un *Pseudomonas*, est spécifique de **l'alpha-terpinéol** et fonctionne sur le même principe. Il est très spécifique et possède un site actif un peu différent **[49]**. Une ferrédoxine appelée **terprédoxine** est très voisine de la putidarédoxine et la remplace dans ce système. Nous avons déjà évoqué les manipulations génétiques destinées à modifier la sélectivité de ces enzymes. On a pu les détourner vers des substrats dits exotiques : chloroéthanes et 1,2-dichloropropane **[50]**, des aromatiques polycycliques (naphtalène, pyrène !) **[51]**. Le naphtalène est oxydé en 1- et 2-naphtol, le pyrène est oxydé en 1,6- et 1,8-pyrènequinone. La mutation Y96F du $P450_{CAM}$ (tyrosine-96 remplacée par phénylalanine) est la plus favorable sur le naphtalène, qui est oxydé aussi vite que le camphre lui-même.

Une application intéressante a été publiée par le groupe de WACKETT **[52]**. Un *Pseudomonas* modifié (*P. putida* G786) portait deux plasmides, l'un ayant les gènes du camphre, l'autre les gènes de la toluène di-oxygénase. La souche était donc armée de deux systèmes ayant chacun une large spécificité et capables de cométaboliser ensemble un **chlorofluorocarbone** (CFC). Le P450 catalysait une déshalogénation réductrice, la di-oxygénase faisait une nouvelle déshalogénation par oxydation.



L'étude a porté sur divers composés en C2 comportant du chlore, du brome et du fluor. Dans le cas du 1,1,1,2-tétrachloro-2,2-difluoroéthane, représenté sur le dessin, la déshalogénation était complète : les bactéries cultivées sur ce produit en présence de camphre (pour induire le P450) transformaient entièrement le substrat en oxalate. L'efficacité dépendait beaucoup de la position des atomes d'halogène. Ici l'un des carbones devait porter 3 Cl, et non pas 2 Cl et un F. Un substrat ayant plus de deux atomes de fluor n'était pas transformé contrairement au 1,1,2,2-tétrabromoéthane (2 Br sur chaque carbone). D'autres combinaisons sont inactives. La souche n'avait donc pas une compétence universelle contre n'importe quel produit halogéné, mais les résultats se sont montrés très prometteurs.

Les cytochromes P450 agissent de préférence sur des positions carbonées aliphatiques. Ils sont répandus chez les actinomycètes où ils contribuent à la synthèse des antibiotiques et à la mobilisation de sources nutritives. Les P450 solubles observés dans le genre *Streptomyces* ont généralement une spécificité bien plus large que celle du P450 du camphre **[53]** et contribuent à éliminer les méthoxyles ($–OCH_3$) sur les produits de dégradation de la lignine.

Oxygénation du gaïacol

L'intervention d'un P450 dans ce type de réaction a été observée chez un *Moraxella* et un actinomycète **[54]**. Elle est représentée par la déméthylation de substrats aromatiques comme le vératrole et le **gaïacol**. L'hydroxylation du carbone méthylique engendre un hydroxyméthyle facilement détaché en formaldéhyde, pour laisser une fonction phénolique sur le cycle intact.

De telles déméthylations ont des conséquences importantes dans l'environnement, car elles engendrent des produits beaucoup plus solubles que les substrats de départ. Dans le domaine pratique, les cytochromes P450 ont des applications potentielles nombreuses et ont l'avantage d'être solubles, contrairement à ceux de la levure et des eucaryotes en général. Ils ont l'inconvénient de fonctionner avec des sources d'électrons auxiliaires qui nécessitent une réductase et une ferrédoxine. D'où l'intérêt des enzymes où tous les facteurs sont intégrés dans une protéine unique. Cette situation est connue dans le cas du cytochrome P450 de *Bacillus megaterium* induit par les barbiturates **[55]**. La protéine soluble de 119 kDa regroupe toutes les fonctions, travaille avec NADPH, contient FMN et FAD et pratique des hydroxylations et époxydations sur des substrats variés.

Ces cytochromes P450 peuvent donc s'en prendre à des dérivés aromatiques, sans toutefois ouvrir le cycle. Revenons au P450 du camphre élaboré par *Pseudomonas putida*. Sa large spécificité lui permet d'hydroxyler faiblement les di- et trichlorobenzènes. Cette propriété montre que la poche du site catalytique est assez large pour que le substrat vienne déplacer les molécules d'eau et se positionner favorablement. L'analyse permet de mesurer deux paramètres importants. Le premier est la constante de dissociation K_d du complexe formé entre le P450 et tel ou tel ligand, en se basant pour cela sur le déplacement spectral par le changement de l'état de spin du fer. La constante mesurée est une concentration du même ordre de grandeur que le *coefficient* K_m*. Le second paramètre est mesuré par un coefficient **k** exprimé en moles par seconde et correspond à la vitesse de la réaction enzymatique dans les meilleures conditions possibles. Le rapport $\mathbf{k/K_d}$ est d'autant plus élevé que la transformation est plus rapide. Un passage au crible des différents substrats possibles permet de construire la carte des molécules acceptées. Divers polychlorobenzènes sont hydroxylés par le P450 du camphre, mais l'efficacité reste très faible par rapport au substrat normal, soit 0,2% seulement pour le 1,3-dichlorobenzène. La faiblesse du résultat est imputable à deux facteurs : une mauvaise adaptation du substrat dans le site catalytique et un certain découplage avec l'oxydation du NADH. Il n'y a que 8% de substrat hydroxylé par rapport au NADH consommé, alors que le rendement est de 100% avec le camphre. Le résultat est encore bien plus mauvais avec le 1,3,5-trichlorobenzène avec un couplage tombant à 1% seulement. Le système oxyde alors beaucoup de NADH en pure perte.

Est-il possible d'améliorer les performances du P450 en modifiant son site actif par génie génétique ? Un travail dans ce sens a été réalisé à Oxford par JONES et coll **[56]**. Il a consisté à diminuer l'espace disponible dans le site actif du P450 en remplaçant la tyrosine ou la phénylalanine par le tryptophane, ou la valine par la leucine. Plusieurs mutations étaient introduites simultanément, et la protéine était exprimée dans un colibacille. Un changement spectaculaire des propriétés du cytochrome a été observé dans certains mutants. Par exemple le rapport k/K_d associé

au 1,3,5-trichlorobenzène est passé de 3.10^2 à $1,5.10^6$ $M^{-1}.s^{-1}$ à l'aide d'une triple mutation, soit une augmentation de 5 000 fois, tandis que l'efficacité du couplage remontait de 1 à 97%.

Ces résultats ont été interprétés par l'effet de tassement du substrat près du fer dans un espace plus resserré, facilitant l'expulsion des molécules d'eau, et une meilleure orientation dans le site. Voici par exemple la transformation du 1,2-dichlorobenzène (1,2-DCB) en 2,3- et 3,4-dichlorophénol.

Oxygénation du 1,2-dichlorobenzène

Il est évident que les produits de la réaction correspondent aux deux possibilités d'hydroxylation, parce que le substrat occupe différentes positions dans le site catalytique. Il est possible de prévoir les produits d'hydroxylation des différents polychlorobenzènes autres que le 1,2-DCB. Ces substrats n'offrent chacun qu'une solution, sauf le 1,3-dichlorobenzène. La figure montre les 4 produits libérés par le P450 d'un triple mutant Y96F-F87W-V247L désigné selon la notation habituelle (par exemple tyrosine-96 remplacée par la phénylalanine).

Hydroxylation du 1,3-dichlorobenzène

Le plus abondant des produits obtenus est le 2,6-dichlorophénol (2,6-DCP). Un examen attentif montre cependant une petite entorse : les 2,5-DCP et 2,3-DCP ne sont pas exactement les produits attendus. Le substrat s'est bien installé à plusieurs positions dans le site, mais une réaction secondaire s'est produite et correspond à un déplacement de substituants sur le cycle aromatique sur le mode du *NIH-shift**. Quoi qu'il en soit, il est visible que le fonctionnement de cette enzyme possède une souplesse d'action remarquable.

De tels travaux montrent qu'il est parfaitement possible de modifier les propriétés d'une enzyme de façon à lui faire accepter plus efficacement des xénobiotiques. Dans le cas cité, le résultat est doublement intéressant, car il permet l'hydroxylation de polluants indigestes et assez insolubles comme les polychlorobenzènes.

En effet l'apparition de la fonction phénolique rend le produit plus facilement métabolisable par la suite. Un cas particulier est l'hydroxylation du 1,2,4,5-tétrachlorobenzène en pentachlorophénol ou PCP, un composé polluant que nous retrouverons au chapitre suivant. L'hydroxylation de l'hexachlorobenzène paraît possible a priori. Pourtant sa transformation en PCP aurait été observée. Ce paradoxe s'expliquerait par une déshalogénation réductrice exercée par le P450 dont le cycle normal serait interrompu comme il a été expliqué.

Les propriétés évoquées dans cette section sont observées essentiellement chez les procaryotes et, dans une certaine mesure, chez les levures. Les cytochromes P450 des mitochondries rappellent ceux des bactéries. Les membranes intracytoplasmiques des animaux et des plantes ont des P450 dont les propriétés diffèrent quelque peu des précédentes, notamment les nombreux P450 qui participent au métabolisme secondaire des plantes. Chez ces derniers, l'oxygène comme substrat peut céder la place au peroxyde et au superoxyde, et la protéine utilise parfois directement NAD(P)H comme source d'électrons.

Cette section nous a montré le caractère remarquable des cytochromes P450, qui abolissent la frontière entre aromatiques et composés saturés. Leur plasticité remarquable autorise leur intervention dans plusieurs réactions sur une palette plus ou moins étendue de substrats.

12.6 - DÉGRADATION ANAÉROBIE DES ALIPHATIQUES

La première culture pure de bactéries anaérobies capables de détruire les alcanes a été décrite en 1991 : un sulfato-réducteur se développait sur hexadécane et autres hydrocarbures à longue chaîne, et les minéralisait jusqu'au stade de CO_2 aux dépens du sulfate comme accepteur d'électrons. Des sulfato-réducteurs sont également capables d'utiliser des alcanes à chaîne plus courte **[57]**. On a cru pendant longtemps que la dégradation des alcanes passait par un stade alcène. Pourquoi ? La création d'une double liaison devrait faciliter l'addition d'une molécule d'eau et greffer ainsi un atome d'oxygène sur la chaîne comme le ferait une oxygénase à partir d'O_2.

L'attaque des hydrocarbures peut se contenter d'une aérobiose très faible, voire de l'absence complète d'oxygène. Au fond des réservoirs de carburant s'accumulent des boues et des gommes plus denses contenant de petites quantités d'eau. Une faible aérobiose à l'interphase favorise la formation d'un film. Il renferme des bactéries et surtout des champignons (*Cladosporium* et *Aspergillus*).

Les conditions compatibles avec une dégradation totalement anaérobie sont maintenant connues pour les alcanes à moins de 6 atomes de C en chaîne droite. Les organismes compétents sont des bactéries réductrices de nitrate ou de sulfate **[58]** ainsi que des méthanogènes **[59]**. La souche AK-01 isolée des sédiments d'un estuaire par SO et YOUNG peut se développer en minéralisant les alcanes par le sulfate. La voie principale de ce métabolisme passerait par un stade alcène et produirait un acide gras. Ces auteurs ont cultivé les bactéries en présence de

n-alcanes à 14, 15, 16 et 17 atomes de carbone marqués au carbone-13 ou deutériés. Les chaînes carbonées de départ se retrouvaient en partie dans les acides gras totaux des bactéries, soit avec le même nombre d'atomes de carbones en chaîne droite, soit avec 2 ou 4 atomes de carbone supplémentaires. Les *n*-alcanes à nombre pair d'atomes de carbone (tétradécane, hexadécane) étaient transformés en acides gras saturés correspondants (C14 : 0, C16 : 0). Le meilleur substrat était le tétradécane. Les *n*-alcanes à nombre impair d'atomes de carbone (pentadécane, heptadécane) donnaient en majorité des acides gras à nombre impair de C, dont certains étaient méthylés latéralement. À titre d'exemple ont été figurés deux acides gras en C15 et C17 méthylés latéralement et formés à partir de pentadécane. De façon générale, les méthyles latéraux des nouveaux acides gras provenaient de l'extrémité de la chaîne dans l'alcane de départ.

$D_3C-CD_2-(-CD_2-)_{12}-CD_3$ — Pentadécane perdeutérié (15:0)

$(D_3C)(HOOC)CH-(-CD_2-)_{12}-CD_3$ — 2-Me-C (15:0)

$(D_3C)(HOOC-(C_2D_2H_2))CH-(-CD_2-)_{12}-CD_3$ — 4-Me-C (17:0)

L'axe carboné de ces hydrocarbures est donc partiellement réutilisé et remanié pour faire de nouveaux acides gras. Le mécanisme précis de l'allongement de la chaîne reste à déterminer. Les acides gras observés sont inhabituels, ne sont pas formés quand les bactéries utilisent des alcènes, des alcanols ou des acides gras. Dans le schéma suivant, qui conserve une part d'hypothèse, aucune augmentation des chaînes carbonées n'est faite par des réactions de carboxylation qui grefferait directement la fonction acide sur l'hydrocarbure.

$(H_3C)(HOOC)CH-(-CH_2-)_n-CH_3$ —oxydation→ $HOOC-(-CH_2-)_n-CH_3$ → → → → → CO_2 (catabolisme)

$(H_3C)(HOOC)CH-(-CH_2-)_n-CH_3$ ⇄ (élongation / β-oxydation) $(H_3C)(HOOC-(CH_2)_2)CH-(-CH_2-)_n-CH_3$ ⇄ (élongation / β-oxydation) $(H_3C)(HOOC-(CH_2)_4)CH-(-CH_2-)_n-CH_3$

Certains auteurs pensent avoir trouvé le mode d'élongation des chaînes **[60]**. L'isolement de germes sulfato-réducteurs à partir de terrains contaminés par du gazole leur a permis d'identifier l'**acide dodécylsuccinique** comme intermédiaire de la dégradation du dodécane. L'identification des dérivés alkylsucciniques a été utilisée par certains auteurs pour détecter la dégradation anaérobie des produits pétroliers dans les nappes phréatiques **[61]**.

Les marquages isotopiques montrent que la chaîne d'hydrocarbure est transmise en bloc dans une réaction de synthèse qui met en jeu probablement le fumarate. Aucun passage par un stade alcène n'est observé. Nous avons déjà rencontré ce type de réaction d'addition dans le passage anaérobie du toluène au benzoate, sous l'action de la benzylsuccinate synthase et d'un cycle faisant intervenir le fumarate. L'oxydation portait sur le méthyle du toluène. Il est tentant de supposer que

l'oxydation du dodécane se fait ici sur un principe tout à fait comparable. En somme cette recette pourrait être caractéristique du carbone aliphatique en anaérobiose.

acide dodécylsuccinique

L'addition de la partie succinique est subterminale et génère deux carbones asymétriques, soit en tout quatre produits diastéréoisomères. Comment le dérivé alkylsuccinique est-il métabolisé ? Sans doute par une voie qui conduit à l'oxydation d'un acide gras. Cette conclusion est corroborée par un travail récent **[62]**. La dégradation anaérobie du *n*-hexane par un dénitrifiant conduit au (1-méthylpentyl)-succinate lié au coenzyme A (**1**) et représenté sur la partie ***a*** du dessin. Ce produit serait ainsi réarrangé en (2-méthylhexyl)-malonyl-CoA (**2**). La réaction peut paraître bizarre, mais ressemble à la conversion du succinyl-CoA (**3**) en méthylmalonyl-CoA (**4**) dans les fermentations propioniques, une réaction classique rappelée en ***b***.

a **1** → **2**

b succinyl-CoA **3** → **4**

Le produit figuré en (**2**) est apparemment décarboxylé en 4-méthyl-octanoyl-CoA, tout comme le malonyl-CoA est décarboxylé en propionyl-CoA. Il correspond à un acide gras ramifié à 9 atomes de carbone dont le métabolisme est connu, formant de l'acétyl-CoA et du propionyl-CoA. On retrouve l'observation souvent faite que la nature sait utiliser des stratégies habituelles pour les appliquer aux biodégradations de produits étrangers.

cyclohexanone → 5-oxocaproate → CO_2, H_2O

Dégradation anaérobie du cyclohexanol

L'attaque anaérobie de divers terpènes est pratiquée par les organismes dénitrifiants. Il y a toujours ouverture du cycle et souvent une minéralisation peut être totale. La transformation du cyclohexanol par un *Pseudomonas* est l'exemple le plus simple et offre la séquence suivante **[63]** :

Plusieurs déshydrogénases (dH), une hydratase et une hydrolase se succèdent jusqu'au 5-oxocaproate, qui est minéralisé. Cette voie diffère du processus aérobie. Les bactéries responsables sont des anaérobies facultatifs et peuvent jouer sur les deux tableaux. Cependant le cyclohexanol est également réduit et aromatisé à 40% en phénol, qui s'accumule dans le milieu. C'est donc une voie en impasse. Les oxydations faites dans la nature avec nitrate comme accepteur sont très variées et il est possible que les connaissances acquises sur la dégradation des aliphatiques dans ces conditions soient encore rudimentaires par rapport à la réalité.

12.7 - DÉCONTAMINATION DE SOLVANTS CHLORÉS

Certaines oxygénases ont une sélectivité très faible et attaquent une gamme étendue de substrats. Les oxygénases du toluène, du naphtalène, du méthane et de l'ammoniac sont dans ce cas. D'autres enzymes peu exigeantes sont les cytochromes P450.

La toluène di-oxygénase de *Pseudomonas putida* F1 fait partie d'un complexe de trois protéines, dont la di-oxygénase proprement dite ou ISP_{TOL}. Elle ne catalyse pas que la dioxygénation de substrats aromatiques mais fonctionne aussi comme mono-oxygénase, désaturase, O- ou N-désalkylase, sulfoxydase. Elle peut oxyder et déshalogéner simultanément des substrats variés, du trichloroéthylène (TCE) à divers aliphatiques insaturés (alcènes) halogénés ou non, contenant 2 à 8 atomes de carbone **[64]**.La réaction est toujours obtenue en présence d'O_2, d'une source d'électrons (NADH), et les produits formés sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Le toluène reste le meilleur substrat. Si on accorde la valeur 100% à la vitesse de dioxygénation du toluène en conditions optimales, la réaction initiale avec le TCE est de 15%, contre 23% avec le 3,4-*dichloro-1-butène (DCB*), 19% avec le *2,3-dichloro-1-propène (DCP*), et moins de 15% pour la plupart des autres substrats. La figure ci-après donne quelques exemples de transformations.

Les caractères généraux observés sont les suivants :

- L'enzyme marche mieux, dans la plupart des cas, si la double liaison est en configuration *cis*.
- Selon les cas, le substrat est mono- ou dioxygéné sans départ de l'halogène. La dioxygénation concerne principalement les substrats dépourvus d'halogène au niveau de la double liaison (sur un carbone dit sp_2), alors que dans le cas contraire une mono-oxygénation porte plutôt sur un carbone voisin, formant un alcool ou un énol (qui se tautomérise en cétone). Pour le 2,3-dichloro-1-propène (DCP de la figure), un réarrangement produit un mélange d'isomères *cis* et *trans*.

- L'expérience montre que l'oxydation tend à ralentir et même à s'interrompre bien avant que le substrat soit transformé en totalité. Ce phénomène s'explique par la formation d'intermédiaires réactifs qui inactivent l'enzyme, notamment par alkylation. C'est important, car ce phénomène intervient souvent au cours de la biodégradation de nombreux xénobiotiques et diminue l'efficacité des procédés biologiques. Le trichloroéthylène, qui est la cible de plusieurs mono- ou di-oxygénases, pourrait sembler facile à éliminer mais engendre ce type d'inhibition.
- D'autres enzymes comme les cytochromes P450 et la méthane mono-oxygénase catalysent des réactions similaires. L'oxydation du 2,3-dichloro-1-propène (DCP) donne deux isomères comme indiqué et correspond au réarrangement appelé allylique par les chimistes. Il est déclenché en principe par la formation d'un carbocation ou d'un radical, qui est obtenu ici par voie enzymatique.

Action sur alcènes halogénés

Le tétrachloroéthylène (Cl_2=CCl_2, **PCE** pour perchloroéyhylène) et le trichloroéthylène (Cl_2C=CHCl, **TCE**) sont d'excellents solvants pour le dégraissage des machines, l'entretien de l'électronique et le nettoyage à sec. Il en a été fait usage en d'énormes quantités déversées inconsidérément dans l'environnement. Ils ne sont malheureusement que lentement biodégradables et leur demi-vie peut dépasser 300 jours. Les sols pollués les conservent parfois longtemps, et ils viennent miner les rivières et les eaux de boisson. Leur élimination est devenue une priorité aux États-Unis et ailleurs. Malheureusement leur transformation biologique peut engendrer au passage du chlorure de vinyle réputé cancérigène.

Ce n'est pas le seul inconvénient, puisque les produits de transformation ont les effets secondaires signalés antérieurement. De façon générale, le PCE est récalcitrant en présence d'air et sa biodégradation ne survient, semble-t-il, qu'en anaérobiose. Par contre le TCE est attaquable aussi bien à l'abri de l'air qu'en présence d'O_2. Il est traité dans le premier cas par une déshalogénase réductrice et dans le second par une oxygénase. Le chlore est toujours éliminé sous forme d'ions chlorure.

Le tableau ci-après donne quelques exemples :

Organisme	O_2	Enzyme	Produit(s) formé(s)
Burkholderia cepacia G4	+	Toluène 2-mono-oxygénase **[65]**	Époxyde, glyoxylate, formiate, CO
Pseudomonas putida F1	+	Toluène di-oxygénase **[66]**	Glyoxylate, formiate
Methylosinus OB3b	+	Méthane mono-oxygénase **[67]**	Chloral, trichloroacétate,
Nitrosomonas europaea	+	Ammoniac mono-oxygénase **[68]**	Glyoxylate ? (non déterminé)
Dehalobacter restrictus	–	Déshalogénase réductrice **[69]**	Chlorure de vinyle
Dehalospirillum multivorans	–	Déshalogénase réductrice **[70]**	1,2-Dichloroéthylène
Sporomusa ovata	–	Déshalogénase réductrice **[71]**	Chlorure de vinyle

La destruction de composés chlorés comme le TCE et produits de la même famille est une propriété fortuite des mono- et di-oxygénases à sélectivité élastique. La toluène di-oxygénase oxyde une foule de substrats. Il en est de même pour les oxygénases du méthane et de l'ammoniac. Nous avons déjà rencontré ces enzymes. Elles exacerbent la réactivité de l'oxygène, créent dans leur site actif une entité hyper-oxydante qui agit tous azimuts sur tout ce qui vient à son contact. Cette stratégie est aussi celle des P450. Les composés halogénés volent en éclats sous leur action avec libération de chlorure, formation de radicaux et apparition de plusieurs produits. Une catégorie intéressante est celle des propane mono-oxygénases présentes dans diverses espèces appartenant au genre *Mycobacterium*. Ces germes peuvent se développer sur des alcanes linéaires contenant 2 à 5 atomes de carbone. Ils attaquent le TCE dans leur sillage en éliminant complètement le chlore, ce que ne fait pas la toluène di-oxygénase **[72]**. Ces bactéries n'attaquent pas le méthane. Inversement celles qui oxydent le méthane sont inopérantes sur ces alcanes.

L'ammoniac mono-oxygénase, dont on sait qu'elle catalyse la première étape de la nitrification des sols, mérite une mention. En oxydant NH_3 en hydroxylamine, elle peut s'en prendre aussi à de nombreuses cibles. Le TCE est l'un d'elles. Il s'agit d'oxydations gratuites (les substrats ne pouvant servir par eux-mêmes à la croissance cellulaire). Un travail de VANNELI et coll. **[73]** a mis en évidence l'attaque de divers substrats halogénés monocarbonés (dichlorométhane, dibromométhane, chloroforme), ou contenant deux atomes de carbone (bromoéthane, 1,1,1-trichloroéthane, chlorure de vinyle, *cis*- et *trans*-dichloroéthylène). Des effets assez compliqués sont observés en fonction de la taille du substrat, du nombre d'atomes d'halogène et de leur position, et il n'est malheureusement pas facile d'en tirer des règles générales claires **[74]**.

Et en **anaérobiose** ? En général la dégradation biologique d'un organochloré est d'autant plus difficile que la molécule contient davantage d'atomes de chlore. Pourtant ce n'est pas toujours le cas. Quelle ne fut pas la surprise d'isoler des bactéries capables de se développer sur des substrats divers en utilisant le

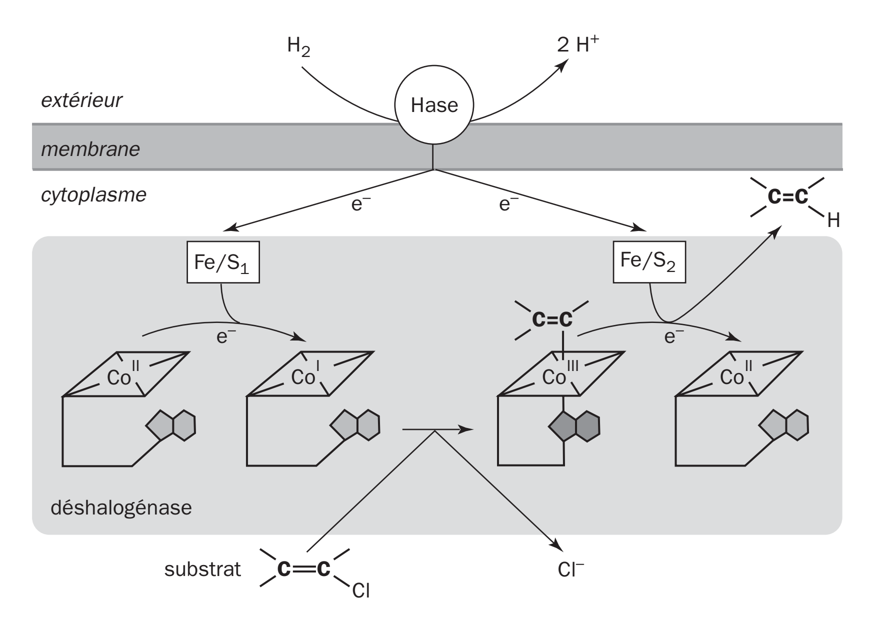
tétrachloroéthylène (PCE) comme accepteur d'électrons ! *Dehalospirillum multivorans* est un anaérobie strict capable de se développer en oxydant l'hydrogène avec le PCE. L'oxydation de H_2 ne peut pas donner lieu à une synthèse d'ATP par couplage au niveau d'un intermédiaire, comme dans une fermentation. Force est d'admettre que la bactérie tire son énergie d'un potentiel membranaire. Une respiration sur tétrachloroéthylène ! Il s'y trouve une déshalogénase réductrice, qui a été purifiée à Stuttgart dans le groupe de DIEKERT **[75]**. L'enzyme transforme le PCE en TCE, puis en *cis*-1,2-dichloroéthylène, le sous-produit de ce mécanisme énergétique respiratoire. La bactérie est donc capable de tirer toute son énergie de l'oxydation de l'hydrogène par le PCE.

$$\text{PCE} \xrightarrow[2e^- + H^+]{Cl^-} \text{TCE} \xrightarrow[2e^- + H^+]{Cl^-} \text{cis-1,2-dichloroéthylène}$$

Comme il arrive souvent dans ce genre de question, le fonctionnement de l'enzyme *in vitro* nécessite l'usage d'un donneur d'électrons artificiel tel que le méthyl-viologène. Le véritable donneur biologique est probablement une ferrédoxine. Chose curieuse, l'enzyme se montre très éclectique et ne touche pratiquement que le PCE et le TCE, tout en étant très efficace. Les deux substrats sont peu solubles dans l'eau (TCE : 1,1 g/L), mais le K_m de l'enzyme est bas, soit seulement 10 µM pour le PCE et 4 µM pour le TCE. Chaque molécule d'enzyme déshalogène plus d'une centaine de molécules de substrat par seconde dans les conditions optimales. On peut s'étonner qu'un tel système existe dans la nature pour détruire des xénobiotiques absents de la planète, il y a plus de 50 ans. Une possibilité : l'enzyme était "prévue" pour des cibles naturelles, mes lesquelles ? On l'ignore.

La PCE déshalogénase fonctionne à l'aide d'un **corrinoïde** assisté par deux centres [4Fe-4S] (ou peut-être un [4Fe-4S] et un [3Fe-4S]). Un corrinoïde ? Nous avons rencontré ce type de constituant apparenté à la vitamine B12 chez les acétogènes et méthanogènes. Le cobalt des corrinoïdes peut osciller entre trois degrés d'oxydation, soit Co(I), Co(II) et Co(III), avec un environnement différent du métal dans chaque cas. Dans un corrinoïde à l'état Co(III), le cobalt est hexacoordonné et une liaison peut-être contractée directement entre le métal et un atome de carbone. Le fonctionnement consiste à commander l'établissement ou la rupture de cette liaison Co–C en fonction de l'état d'oxydation. Cette question mérite un détour. Le schéma est celui de NEUMANN et coll. **[75-76]**.

Les électrons nécessaires à la réduction sont apportés par une hydrogénase (Hase) de la face externe de la membrane. Ils sont canalisés par les deux centres fer-soufre de l'enzyme, désignés sur la figure suivante par Fe/S_1 et Fe/S_2. Le passage est sans doute facilité par l'ancrage de l'enzyme sur la face interne de la membrane. Les deux protons dégagés sur la face externe par l'oxydation d'une molécule de H_2 contribuent à établir le potentiel membranaire. Le shéma symbolise le comportement du corrinoïde qui rappelle celui que nous avons entrevu page 210.



Fonctionnement de la PCE déshalogénase

Il y a trois conversions du cobalt de Co(II) à Co(I), de Co(II) à Co(III) lié à un élément carboné, enfin de celui-ci à Co(II). L'établissement d'une liaison Co–C accompagne l'oxydation de Co(I) en Co(III), avec perte d'un ion chlorure. La réduction de Co(III) en Co(II) chasse le produit de la réaction. Les potentiels d'oxydoréduction des couples Co(II)/Co(I) et Co(III)/Co(II) sont très différents. Le premier est estimé à – 350 mV et au-dessous, le second à plus de 150 mV. Il en résulte que la réduction de Co(II) par H_2 à gauche sur le schéma est peu favorable thermodynamiquement, alors que celle de Co(III) est énergétique, et sert à orienter le mécanisme vers la déshalogénation.

Ce modèle conserve une part d'hypothèse tout en étant conforme à ce qui est observé dans d'autres systèmes lorsque des noyaux fer-soufre et des corrinoïdes sont mis en jeu. Sur la figure ont été symbolisés les états *base-off* (pas de 5e coordinence) et *base-on* (5e coordinence en place) comme expliqué antérieurement dans l'étude des acétogènes ainsi qu'en glossaire.

Quand un système non-conformiste est trouvé, on compte sur l'analyse des séquences pour trouver des parentés évolutives avec d'autres germes et détecter de nouvelles souches dans l'environnement. Dans le cas qui nous occupe, les ressemblances restent problématiques **[77]**. Cette déshalogénase remarquable est-elle un cas unique dans l'environnement ? Apparemment non. Une autre bactérie capable de déchlorer le PTE et le TCE a été étudiée en Suisse **[78]**. Il s'agit d'un Gram-positif strictement anaérobie, *Dehalobacter restrictus*, voisin des *Clostridium*. Sa membrane est entourée d'une *couche S**. Son fonctionnement est fondé sur une respiration construite en grande partie comme il vient d'être expliqué. Il fait intervenir un corrinoïde. Les électrons seraient canalisés vers l'enzyme par une ménaquinone, qui remplace couramment l'ubiquinone en anaérobiose. Un troisième

germe assez particulier a été isolé aux Etats-Unis [79], une eubactérie possédant aussi une couche S mais difficile à classer. Cette nouvelle espèce, contrairement aux précédentes, peut déchlorer complètement le PCE en éthylène et produire au passage du chlorure de vinyle.

En conclusion de cette section, la biodégradation des solvants chlorés est possible dans des conditions assez variées. L'attaque aérobie procède essentiellement de l'action des oxygénases peu spécifiques, et la dégradation anaérobie utilise le cas échéant un métabolisme respiratoire particulier où le solvant sert d'accepteur, et où des corrinoïdes sont des facteurs essentiels.

12.8 - La déshalogénation et ses divers modes

L'industrie a créé de très nombreux xénobiotiques halogénés dont l'élimination peut poser problème. Quels sont les principes généraux qui président à l'enlèvement de l'halogène ? La question apparaît bien documentée dans le cas des aromatiques. Les chapitres précédents ont montré qu'un atome d'halogène pouvait être ôté sous forme d'anion halogénure au cours des tout premiers stades du métabolisme ou à un stade ultérieur. La biochimie de la déshalogénation offre des situations variées, mais souvent élucidées de manière incomplète. Cette section s'efforce de récapituler les principaux procédés en donnant des exemples où nous retrouverons quelques aromatiques. La déshalogéntion hydrolytique des alcanes sera réservée à une section ultérieure. Cette section revient sur les différents procédés, dont certains ont déjà été abordés à propos des aromatiques. Limitons la question à quelques exemples.

L'halogène est toujours éliminé sous forme d'ion halogénure. Son départ est provoqué par une oxydoréduction, une hydrolyse, une élimination, une hydratation ou une substitution. Le tableau est une récapitulation des différents procédés touchant les aromatiques et les aliphatiques.

Type de réaction	Exemple
Réductrice	Oxydoréduction à 2 électrons. L'atome d'halogène est libéré en halogénure et un atome d'hydrogène le remplace. Surtout aérobie. $^{-}OOC{-}C_6H_4{-}Cl \xrightarrow{H^+ + 2\,e^-} {}^{-}OOC{-}C_6H_5 + Cl^-$; $Cl_2C{=}CCl_2 \xrightarrow{H^+ + 2\,e^-} Cl_2C{=}CHCl + Cl^-$
Par oxygénation	Rencontrée chez les aromatiques et uniquement aérobie. $C_6H_4(COO^-)(Cl) \xrightarrow[NADH,\ H^+]{O_2} C_6H_4(OH)_2 + CO_2 + NAD^+ + H_2O$

Type de réaction	Exemple
Hydrolytique	Une halo-acide déshalogénase chasse l'halogène d'un halo-alcane. $R{-}CH_2Cl + H_2O \longrightarrow R{-}CH_2OH + HCl$
Déshydrohalogénation	Par désaturation comme dans le cas du lindane (β-hexacyclohexane). $C_6H_6Cl_6 \xrightarrow{-HCl} C_6H_5Cl_5$
Hydratation	Le 3-chloroacrylate est déchloré en malonate semialdéhyde. $^-OOC\text{-}CH{=}CHCl \xrightarrow{H_2O} \xrightarrow{-HCl} {}^-OOC\text{-}CH_2\text{-}CHO$
Substitution intramoléculaire	Le 3-chloroacrylate est déchloré en malonate semialdéhyde. $CH_2OH{-}CHOH{-}CH_2Cl_2 \longrightarrow CH_2OH{-}CH{-}CH_2 \text{ (époxyde, O)} + HCl$
Déshalogénation par glutathion (GSH)	Représentée par la conversion bactérienne du dichlorométhane en formaldéhyde et HCl. $CH_2Cl_2 + GSH \longrightarrow [GS\text{-}CH_2Cl] + HCl$ $[GS\text{-}CH_2Cl] + H_2O \longrightarrow GS\text{-}CH_2OH + HCl$ $GS\text{-}CH_2OH \rightleftharpoons HCHO + GSH$

La déshalogénation réductrice, qui remplace l'halogène par H, semble très simple dans son principe, mais son mécanisme exact est mal connu. On pourrait le concevoir ainsi, comme un départ du chlorure avec formation d'un carbocation, l'apport d'un proton, et une réduction à deux électrons :

$$-\underset{H}{\overset{Cl}{C}}- \xrightarrow{-Cl^-} -\underset{H}{\overset{+}{C}}- \xrightarrow{2\,e^- + H^+} -\underset{H}{\overset{H}{C}}-$$

Cette réduction est anaérobie et porte aussi bien sur des haloaromatiques que sur des aliphatiques halogénés. Le potentiel redox attaché aux aromatiques (Ar-Cl/Ar-H) à pH 7 est du même ordre de grandeur que celui du couple NO_3^-/NO_2^-. Pour les aliphatiques, le potentiel correspondant (Al-Cl/Al-H) est entre 0,3 et 0,52 V, c'est-à-dire à peu près dans la même gamme. Un anaérobie facultatif, comme le colibacille, est capable de transformer le tétrachlorométhane en trichlorométhane (le chloroforme) lorsqu'il se développe en anaérobiose avec le fumarate comme accepteur **[80]**. Il y a de très nombreux exemples de telles déshalogénations anaérobies où la production de l'énergie nécessaire provient de méthanogénèse, de la réduction du sulfate ou de la dénitrification [**81**].

Un cas remarquable est celui de *Desulfomonile tiedjei*, un anaérobie qui peut coupler la réduction du sulfite à la déshalogénation d'une série de substrats chlorés, bromés ou iodés. La source d'électrons est H_2 ou le formiate. L'accepteur est le substrat halogéné ou le sulfite. Il y a une compétition pour l'hydrogène entre les deux voies qui sont l'une et l'autre des mécanismes respiratoires générateurs d'énergie. Une respiration ? En effet, ces oxydoréductions sont couplées à un potentiel membranaire, qui actionne à son tour une synthèse d'ATP **[82]**. Un schéma tente de l'expliquer, montrant la déshalogénation des *m*-halobenzoates, du tétrachloroéthylène et du penta-chlorophénol. L'attaque réductrice de ce dernier n'est pas le seul mode de déchloration, qui peut s'effectuer aussi sur le mode hydrolytique.

Desulfomonile tiedjei

Le brome et l'iode sont retirés de n'importe quelle position sur les halobenzoates et halobenzamides, alors que le chlore ne l'est qu'en position *méta*. Ces bactéries ont donc la particularité d'effectuer leur respiration sur des accepteurs inédits. *D. tiedjei* est l'un des rares germes connus jusqu'à présent qui peuvent tenir ce métabolisme sans participation étrangère. On retrouve ce type de respiration dans d'autres cas où les bactéries sont généralement en association avec d'autres germes dont les méthanogènes. Ces associations avec bénéfices mutuels sont essentielles dans la nature. Tous les aspects de ces déshalogénations n'ont pas été répertoriés, mais on peut penser que ces réactions sont communes. Des *Pseudomonas*, *Arthrobacter* et autres germes du sol sont parmi les protagonistes. L'anaérobiose privilégie apparemment la déshalogénation réductrice de substrats halogénés très variés.

12.9 - DÉSHALOGÉNATION HYDROLYTIQUE DES HALOALCANES

L'introduction d'un atome d'oxygène à partir de l'eau peut conduire à l'enlèvement d'un halogène sans aucune intervention d'O_2. Il existe un certain nombre de systèmes bien répertoriés pour effectuer ce genre de réaction. Les déshalogénases hydrolytiques concernées sont appelées **halidohydrolases**. Une espèce méthylotrophe facultative et fixatrice d'azote, *Xanthobacter autotrophicum*, possède ce type d'enzyme, dont le substrat préféré est le 1,2-dibromoéthane, un additif de l'essence sans plomb, un pesticide agricole et un intermédiaire dans des synthèses industrielles. Les espèces compétentes tirent parallèlement leur énergie d'oxydations faites en présence d'O_2. Un tableau rassemble quelques exemples.

Bactéries	*kDa*	*Substrats déshalogénés**	*nombre de C*
Xanthobacter autotrophicus GJ10 **DhlA**	35	1-bromo- et 1-chloroalcanes 1-iodopropane, α,ω-dihaloalcanes	1-4, 1-12 3, 2-3
Xanthobacter autotrophicus GJ70	28	Halométhanes 1-chloroalcanes, 2-bromoalcanes α,ω-dichloroalcanes, alcools halogénés 1,2-dibromopropane	1 2-5, 3-5 2-9, 2-6 3
Corynebacterium m15-3	36	Bromoéthane, 1,2-dibromoéthane 1-chloroalcanes, α,ω-dihaloalcanes α-chloro-ω-alcanols	2 2-9, 2-9 3-4
Rhodococcus erythropolis Y2, *Rhodococcus* m15-3, DhaA	34	1-chloroalcanes, α,ω-dihaloalcanes α-chloro-ω-alcanols, trihalopropanes	3-16, 2-10 2-4, 3
Rhodococcus HA1	36	1-iodoalcanes, 1-bromoalcanes 1-chloroalcanes, α,ω-dihaloalcanes α-chloro-ω-alcanols	1-7, 2-10 2-10, 3-6 4-6
Pseudomonas paucimobilis UT26 **LinB**	33	1-chlorobutane, 1-chloroalcane 2-chlorobutane, 2-chlorooctane 3-chlorohexane	4, 9-10 4, 8 6

* Ont été omis pour simplifier des substrats secondaires, des alcools, époxydes et éthers halogénés.

L'enzyme **DhlA** a été séquencée après clonage et possède une chaîne de 310 acides aminés codée par un plasmide. On en connaît la structure détaillée **[83]**. Le site catalytique est enfoui dans la molécule et possède un environnement particuièrement hydrophobe représenté sur un dessin. On y rencontre la leucine, la phénylalanine, le tryptophane et la valine, le substrat étant le **1,2-dichloroéthane**.

Il a été montré par mutagenèse dirigée que le site renferme trois résidus essentiels, Asp-124, Asp-260 et His-289 (shéma de la page suivante), les principaux acteurs d'une catalyse acide-base, dont nous retrouverons le principe plus loin. On constate ainsi une vague homologie avec d'autres hydrolases comme les protéases à sérine, qui ont également une triade de trois acides aminés essentiels (sérine, histidine, aspartate).

Environnement du 1,2-dichloroéthane dans la déshalogénase de Xanthobacter

La liaison carbone-chlore se positionne entre deux résidus de tryptophane (Trp-125 et Trp-175). L'aspartate-124 exerce une attaque nucléophile sur le substrat, écarte le chlore sous forme de chlorure et forme une liaison covalente transitoire. Une hydrolyse de cette liaison est catalysée par l'histidine-289 agissant comme base. Le principe est symbolisé ainsi, E^- étant l'enzyme (la charge – est celle Asp-124) et RX le substrat. Dans un premier temps :

$E^- + RX \rightarrow E.RX \rightarrow E\text{-}R, X^-$ (une substitution : la liaison E–R remplace la liaison R–X).

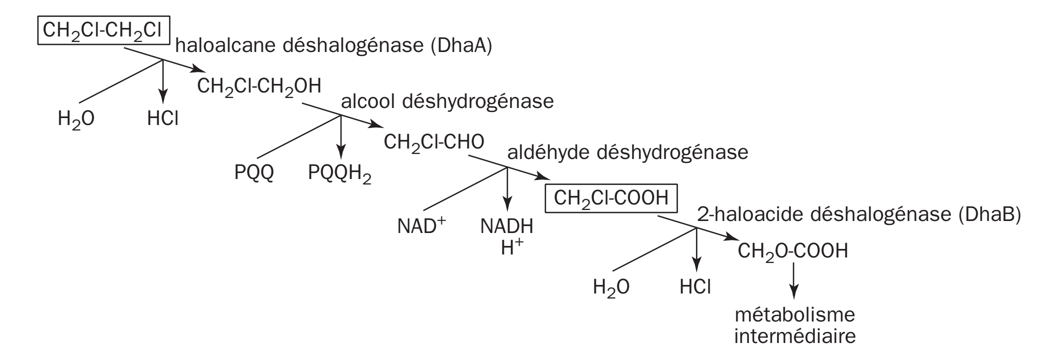
À l'étape suivante intervient une molécule d'eau pour rompre la liaison :

$E\text{–}R, X^- + OH^- + H^+ \rightarrow EH, ROH, X^-$, puis finalement : $E^- + ROH + H^+ + X^-$.

L'étude cinétique suggère que l'alcool quitte l'enzyme avant l'ion halogénure. Le départ de ce dernier est l'étape limitante du processus, qu'on explique par un petit changement de conformation de la protéine avant de s'en débarrasser. Paradoxalement ce n'est donc pas l'attaque de la liaison carbone-halogène qui pose le plus gros problème pour la dégradation de ces xénobiotiques, mais l'évacuation du chlorure ou du bromure, et d'ailleurs un excès de ces ions dans le milieu inhibe la réaction. Les études de SCHANSTRA et coll. suggèrent que la spécificité limitée de l'enzyme (voir le tableau précédent) est réglée par l'insertion de la chaîne carbonée dans le site actif et le positionnement correct de la liaison C–X entre les deux tryptophanes et l'expulsion de l'halogénure. Des modifications de l'enzyme par mutagénèse pourraient la rendre moins sélective en lui faisant détruire une gamme plus étendue d'haloalcanes.

Lorsque le substrat contient deux atomes d'halogène comme dans le **1,2-dichloroéthane**, un seul est enlevé dans un premier temps et il se forme un chloroalcool sur lequel l'enzyme est sans action. L'enlèvement du deuxième halogène rend nécessaire l'intervention d'une autre déshalogénase. L'alcool déshydrogénase a la particularité d'admettre le **PQQ*** comme cofacteur. Nous l'avons rencontré dans l'oxydation du méthanol. Les données rassemblées avec d'autres systèmes biologiques permettent de présumer son intervention. La déshalogénase DhlB de *X. autotrophicum* élimine le deuxième atome de chlore. C'est une 2-haloacide déshalogénase que nous retrouverons pages 577 et 578.

Le métabolisme du 1,2-dichloroéthane serait le suivant **[84]** :



Des halidohydrolases analogues à DhlA sont assez répandues dans les espèces du sol et donnent parfois lieu à des situations intéressantes. Par exemple un *Mycobacterium* métabolise complètement le 1,2-dibromoéthane **[85]**, ce qui est rarement observé parce que les produits intermédiaires formés sont toxiques à faible taux. Le gène de la déshalogénase DhaA a été cloné et séquencé. Il a donné lieu à une observation étonnante. Il est presque identique au gène d'une déshalogénase trouvée chez une autre espèce, *Rhodococcus rhodocrous*, mais il est un peu plus long et comporte une partie correspondant à une haloalcool déshalogénase de *Corynebacterium*. On a donc l'impression que la pression sélective exercée sur une association bactérienne par le dibromoéthane a fait apparaître la recombinaison et la propagation de séquences nucléiques entre espèces différentes. La minéralisation du 1,2-dibromoéthane passe par un époxyde dont on ne connaît pas la voie de transformation.

Br–CH_2–CH_2–Br $\xrightarrow{H_2O \;\; HBr}$ Br–CH_2–CH_2–OH $\xrightarrow{HBr}$ CH_2–CH_2 (O) $\longrightarrow$ minéralisation

Passage par un époxyde

Malgré toutes ces possibilités encourageantes, de nombreux pesticides halogénés offrent chaque fois des risques à l'environnement. À défaut d'une interdiction d'emploi, les effets sont combattus par la sélection de souches appropriées. Le 1,2,3-tribromopropane et le 1,2-dibromo-3-chloropropane sont des nématocides à usage agricole et figurent parmi les produits à risque. Éventuellement cancérigènes et relativement récalcitrants, ils inhibent la croissance des micro-organismes du sol et sont entraînés facilement dans les nappes aquifères. Les chercheurs du groupe néerlandais de Janssen ont pu modifier génétiquement *Agrobacterium radiobacter*, rendant cette bactérie capable de se développer efficacement sur les propanes trihalogénés **[86]**. Pour y parvenir ils ont utilisé le gène de la déshalogénase DhaA d'un *Rhodococcus* mt15-3. Cette enzyme est très voisine de celle de *Xanthobacter* décrite ici, mais se montre plus performante. Le gène a été recombiné à différents promoteurs sur un plasmide et introduit avec celui-ci dans *A. radiobacter*.

La nouvelle souche fabrique la déshalogénase à taux élevé et se multiplie sur 1,2-dibromo-3-chloropropane comme seule source de carbone, ce qui est remarquable. La vitesse de conversion du substrat initial lui permettait en même temps de mieux résister aux effets toxiques. Les trois atomes d'halogène seraient éliminés ainsi l'un après l'autre :

Trihalopropane
X = Cl ou Br

$CH_2X{-}CHX{-}CH_2X \xrightarrow{H_2O,\ -HX} CH_2X{-}CHX{-}CH_2OH \xrightarrow{-HX}$ (époxyde) $CH_2X{-}CH(O){-}CH_2$

$\xrightarrow{H_2O} CH_2X{-}CHOH{-}CH_2OH \xrightarrow{-HX}$ (époxyde) $CH_2(O){-}CH{-}CH_2OH \xrightarrow{H_2O} CH_2OH{-}CHOH{-}CH_2OH$

Trihalopropane

Les chercheurs ont également examiné la dépollution du 1,3-dichloropropène (ou 1,3-dichloropropylène **[87]**). Ce produit est également un nématocide. Il aurait été utilisé en Hollande sur les champs de pommes de terre, à des taux pouvant atteindre 170 kg par hectare, qui représentent plusieurs milliers de tonnes répandus dans les champs sur une année ! La moitié s'évapore dans l'atmosphère des Pays-Bas et y crée une pollution non négligeable. Il a été possible de sélectionner un *Pseudomonas cichorii* 170, capable de croître sur différents composés halogénés comme seule source de carbone, soit le 1,3-dichloropropène, des 1-haloalcanes et différents dérivés oxygénés. La déshalogénation hydrolytique initiale procède du schéma habituel :

$ClHC{=}CH{-}CH_2Cl \xrightarrow{H_2O,\ -HCl} ClHC{=}CH{-}CH_2OH$

1,3-dichloropropène

1,3-dichloropropène

Les résultats obtenus jusqu'ici suggèrent que la première étape de biodégradation est souvent l'évènement crucial et le goulot d'étranglement à la suite duquel le reste du métabolisme peut se dérouler plus rapidement. Ces exemples montrent que la construction génétique de nouvelles souches permet une avancée utile dans la bioremédiation des milieux contaminés par des substances théoriquement récalcitrantes. Tout compte fait, la dépollution des milieux contaminés par les nombreux ingrédients chlorés, bromés ou iodés inventés par l'homme semble à notre portée. Un problème pratique demeure cependant. Les microbes dont on sollicite les compétences doivent se développer le plus rapidement possible. On utilise alors leur pouvoir de dégrader les alcanes. L'astuce consiste à injecter dans un sol contaminé par des organochlorés un mélange contenant de l'air et du gaz propane dans des proportions assez faibles pour écarter le risque d'explosion. Les bactéries se développent en oxydant le propane comme source de carbone et d'énergie. Elles en profitent pour attaquer le reste. C'est ce qu'on appelle un cométabolisme utile !

12.10 - LE CAS DES 2-HALOACIDES

L'élimination de l'halogène à partir d'un 2-haloacide est de type hydrolytique et obéit au principe général : R–CHX–COOH + OH^- → R–CHOH–COOH + X^-. Substrats et produits ont une chiralité sur le carbone 2 que la transformation conserve ou inverse selon le mécanisme mis en jeu. Les déshalogénases ou halidohydrolases peuvent être classées en 4 catégories principales **[88]**.

	Caractéristique	SH*	Source (exemple)
1	Sur *L*-2-haloacide, inverse la chiralité	±	*Pseudomonas* sp. YL (HI, HII) **[89]**
2	Sur *D*- et *L*-2-haloacides, inversion de chiralité	–	*Pseudomonas putida* PP3 (DehII) **[90]**
3	Sur *D*- et *L*-2-haloacides, rétention de chiralité	+	*Pseudomonas putida* PP3 (DehI) **[91]**
4	Sur *D*-2-chloropropionate, inverse la chiralité	–	*Rhizobium sp.* **[92]**, *P. putida* AJ1

* Sensibilité aux réactifs des thiols (+) quand la réaction est bloquée (–) dans le cas contraire

Le tableau montre une pluralité de modes d'action. Les deux lignes intermédiaires (2 et 3) citent une attaque peu sélective sur les énantiomères *D* et *L*, mais une espèce inverse la chiralité des molécules transformées, alors que l'autre la conserve. Cette multiplicité peut s'avérer intéressante pour les biotechnologies utilisant ces déshalogénases en vue de réaliser des réactions stéréospécifiques, non seulement pour la dégradation de substances toxiques, mais pour la confection d'intermédiaires de synthèse dans l'industrie des herbicides et pesticides et appelés synthons.

Les enzymes de la première catégorie sont de loin les plus étudiées, en particulier la déshalogénase des ***L*-2-haloacides** de ***Pseudomonas* YL**. La réaction engendre un *D*-2-hydroxyacide. Cette enzyme est abondante, relativement thermostable. Elle a la structure d'un homodimère (2 × 26 kDa), réagit dans un solvant organique sur les substrats à courte chaîne (2 à 5 carbones), mais attaque les substrats à chaîne longue (16 carbones et plus) en solution aqueuse. Au moins une dizaine de déshalogénases similaires ont été isolées ou mises en évidence chez diverses souches de *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Xanthobacter autotrophicus* **[93]** et forment une famille de protéines homologues. *Pseudomonas* CBS3 possède deux déshalogénases isofonctionnelles (des isoenzymes), DehCI et DehCII, homologues à 45% **[94]**. On ne sait pas si cette double présence dans les mêmes bactéries résulte d'une acquisition fortuite après un transfert génétique et si elle répond à un avantage physiologique. *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 a été étudié en détail, car ce germe produit constitutivement deux halohydrolases : l'une est DhlA, déjà rencontrée, active sur le 1,2-dichloroéthane et quelques haloalcanes, l'autre ou DhlB qui est active sur les haloalcanoates. Ces deux systèmes appartiennent à des familles distinctes sans homologie entre elles, et n'utilisant pas exactement le même principe de fonctionnement. Cette observation laisse supposer que ces différentes familles d'enzymes ont fait leur apparition dans l'évolution par des voies complètement indépendantes.

Revenons à la déshalogénase de *Pseudomonas* **YL** (catégorie 1 du tableau) et aux enzymes apparentées. Une réaction catalysée est la transformation du *L*–2–chloropropionate en *D*-lactate [9] :

$$CH_3–CHCl–COO^- + H_2O \longrightarrow CH_3–CHOH–COO^- + HCl$$

La protéine est bien connue par sa structure et sa séquence. Un site carboxylique (aspartate) exerce une substitution nucléophile (SN2), établit une liaison covalente transitoire qui s'hydrolyse ensuite avec inversion de configuration.

Conversion du L-2-chloropropionate en D-lactate

Le chlore est éliminé en chlorure et se fait remplacer par un atome d'oxygène. Le problème est de savoir quelle est l'origine de cet oxygène dans le lactate. De l'eau ? La figure suggère qu'il n'en est rien, et que cet oxygène vient de l'enzyme. Ceci a été démontré à l'aide d'eau marquée à l'oxygène-18 et de la spectrométrie de masse **[95]**. Dans un premier temps, l'enzyme et son substrat sont mélangés dans la même proportion. Le cycle catalytique ne peut alors tourner qu'une seule fois, tout le substrat ayant été consommé instantanément. Si l'eau intervenait dans une simple hydrolyse de la liaison ester formé sur l'enzyme, le lactate devrait emporter l'oxygène-18 pendant que l'enzyme garderait son oxygène-16. Ce n'est pas le cas. La spectrométrie de masse montre que le lactate est pratiquement dépourvu d'oxygène-18, et que l'isotope se retrouve sur l'enzyme.

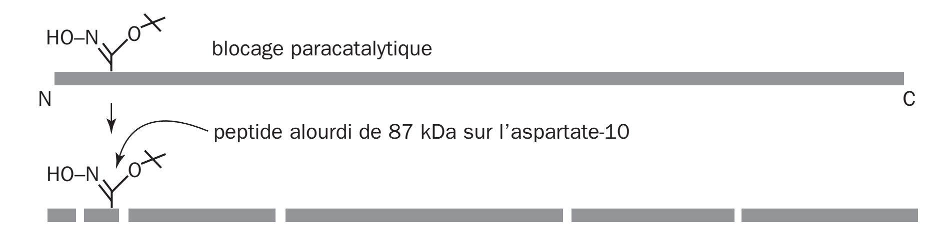
C'est ce que nous voyons sur le schéma : l'attaque de l'eau s'est portée sur le carbone du C=O, et l'atome d'oxygène récupéré dans le lactate provient de l'enzyme. Si maintenant on rajoute un peu plus de substrat de façon à laisser le cycle catalytique tourner plusieurs fois, le *D*-lactate formé se charge en oxygène marqué. En effet, l'enzyme alimentée en isotope à partir de l'eau le transmet au produit de la réaction au cours des cycles suivants. La contre-épreuve est la suivante. On laisse fonctionner l'enzyme dans l'eau marquée de telle façon qu'elle récolte le maximum d'isotope. Le substrat et le produit sont ensuite éliminés par ultrafiltration et lavage de l'enzyme avec un tampon contenant de l'eau ordinaire.

---

9 - Une mesure simple est l'estimation du D-lactate formé par une D-lactate déshydrogénase et l'enregistrement de l'absorbance à 340 nm du NADH. Une autre méthode est polarimétrique par une électrode de mesure des ions chlorure. À citer aussi la détermination spectrophotométrique du chlorure par le thiocyanate mercurique et le sulfate d'ammonium/fer(III) dans l'acide sulfurique.

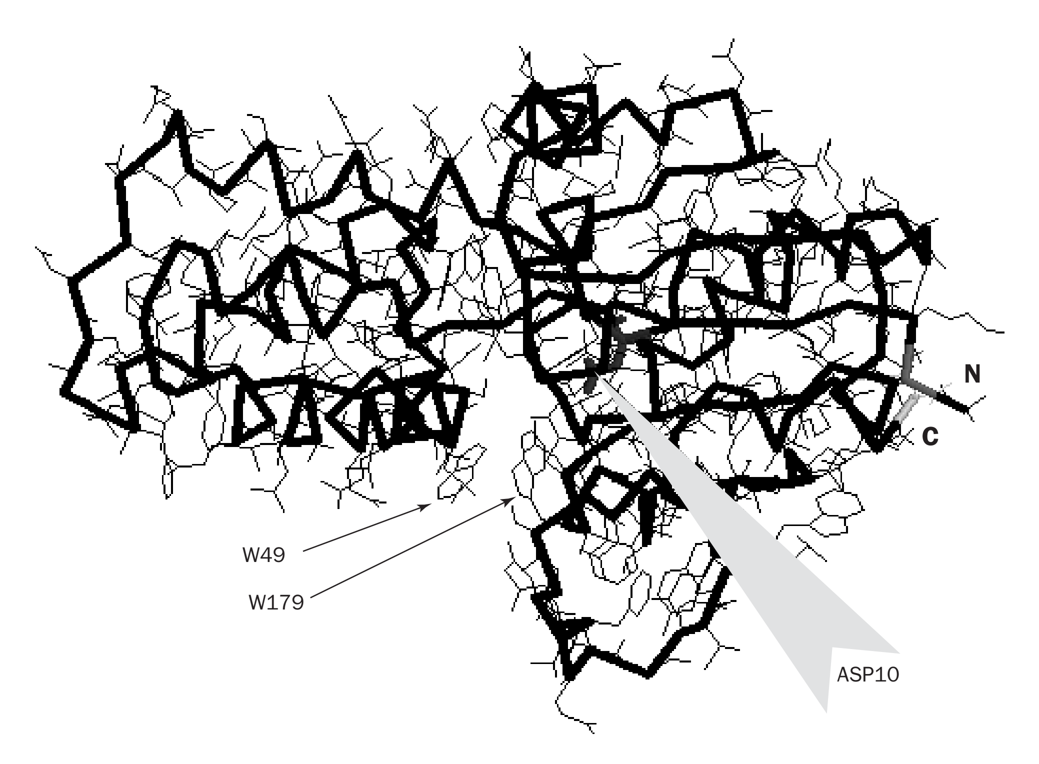
Au bout d'un seul cycle réactionnel comme précédemment, le lactate emporte l'oxygène-18, alors qu'au bout de plusieurs cycles, le lactate formé est dépourvu de cet isotope.

Les recherches ont permis d'identifier l'acide aminé responsable de l'opération dans la séquence. Il est proche de l'extrémité N-terminale de chaque chaîne (Asp-10), conservé dans toutes les séquences homologues. Son remplacement par mutation supprime l'activité de l'enzyme. Plus récemment, une expérimentation adroite par LIU et coll. **[96]** a confirmé le caractère essentiel de Asp-10. L'hydroxylamine (NH_2OH) inactive l'enzyme de façon paracatalytique (en bloquant un intermédiaire réactionnel du cycle). Elle établit une liaison covalente avec la protéine quand celle-ci fonctionne avec le chloroacétate ou le *L*-2-chloropropionate comme substrat. Il a fallu identifier à quelle position se fait le blocage. La protéine a donc été découpée en peptides et la masse précise de chacun d'eux a été vérifiée pour détecter une augmentation éventuelle. Le peptide alourdi est précisément celui qui contient Asp-10, et la différence de masse correspond à la fixation de l'hydroxylamine (sur le carbonyle en hydroxamate) et à la présence du substrat.



Le dessin suivant représente la structure du monomère dans la 2-haloacide déshalogénase de *Pseudomonas* YL. L'image a été construite d'après les données déposées par HISANO et coll. **[97]**. Le polypeptide est arrangé en deux domaines probablement articulés dans une zone qui occupe le fond de la crevasse formée par le site actif (ouverte vers le bas de la figure). Cette disposition en deux domaines articulés autour d'un site catalytique n'est pas rare dans la structure des enzymes, à la façon des lames tranchantes d'une paire de ciseaux. Le résidu essentiel, Asp-10, est tapi dans cette zone. Le domaine figuré à gauche contient 4 hélices alpha, celui de droite a un feuillet bêta bordé d'hélices. La chaîne principale est en trait épaissi, les chaînes latérales des acides aminés en traits plus fins. À l'entrée du site se tiennent les deux "gardiens", les tryptophanes 49 et 179.

Certaines positions entourant le sillon du site actif sont conservées dans les protéines homologues de la même famille, et leur importance a été vérifiée en les remplaçant un à un par mutation. Un détail curieux est visible à droite du dessin : les acides aminés N et C terminaux sont rapprochés. Cette particularité n'est pas rare dans les structures protéiques et sa signification n'a pas d'explication certaine. Plusieurs modélisations ont été publiées, notamment celle de LI et coll. avec 2-chlorobutyrate en place dans le site **[98]**.

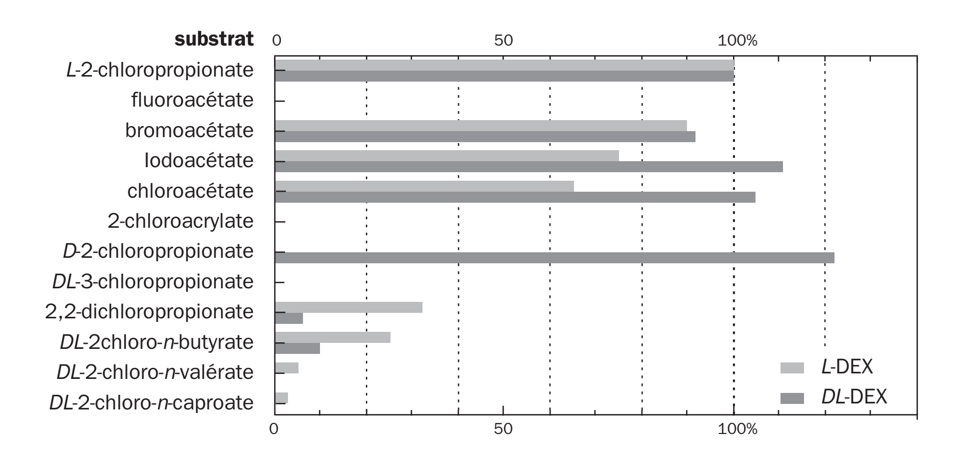


2-haloacide déshydrogénase

La famille formée par ces enzymes diffère des trois autres catégories de déshalogénases du tableau.. Il n'est pas rare qu'une même souche synthétise plusieurs enzymes distinctes. C'est précisément le cas de *Pseudomonas* YL examiné par LIU et coll **[99]**. Sur 2-chloropropionate comme seule source de carbone, la déshalogénase induite est n'active que sur les dérivés *L* (catégorie 1 du tableau). Elle est relativement thermostable et a deux sous-unités égales de 26 kDa dont nous avons aperçu la structure. En croissance sur 2-chloroacrylate, les bactéries fabriquent une déshalogénase active sur dérivés *L* et *D* (catégorie 2 du tableau).

Les deux enzymes fonctionnent de façon optimale à pH alcalin (pH 9-10) et provoquent une inversion de configuration. La seconde est monomérique (36 kDa). Voici page suivante un diagramme permettant de comparer l'activité des deux protéines sur plusieurs chloroacides. Elles sont désignées respectivement par *L*-**DEX** et *DL*-**DEX**. La longueur de chaque barre compare pour chaque enzyme l'activité sur un substrat donné à la valeur obtenue sur le *L*-2-chloropropionate ramenée à 100%.

La *L*-DEX a la possibilité de fonctionner dans le *n*-heptane qui offre un milieu commode pour tester l'enzyme sur des halodérivés à longue chaîne, peu solubles dans l'eau.



Les substrats sont dissous dans l'heptane et l'enzyme est ajoutée à l'état lyophilisé [10]. La vitesse de conversion du *L*-2-chloropropionate dans l'heptane est seulement 3% de celle qui est observée dans l'eau. Mais on peut voir que l'enzyme déshalogène des substrats chlorés et bromés ayant 8 à 16 atomes de carbone. On remarquera l'absence d'activité des deux enzymes sur le fluoroacétate. Le problème du fluor mérite un petit détour. La plupart des plantes communes ont de faibles quantités de fluor, de l'ordre de quelques µg par g de poids sec. Une partie de ce fluor existe est celui du fluoroacétate, dont la teneur est de 10 à 200 ng (très variable en fonction des parties de la plante, du lieu et de l'espèce). Il y en a ainsi des traces dans le thé, à un taux beaucoup trop insignifiant pour constituer un danger quelconque, car le fluoroacétate est un poison violent pour les animaux. Sa conversion en fluorocitrate bloque le cycle de KREBS au niveau de l'aconitase, les organes les plus sensibles étant le cœur et le cerveau. Le fluoroacétate a été utilisé comme raticide (désigné comme poison 1080), et pour lutter contre la prolifération de certains prédateurs (il aurait été utilisé contre les coyotes dans l'Ouest américain). Certaines plantes contiennent des quantités exceptionnellement élevées de fluoroacétate, et sont toxiques pour les herbivores qui les consomment. La plus connue est *Dichapetalum cymosum*, une plante d'Afrique du Sud où la teneur dépasse 230 µg par g de poids sec. La plus haute concentration est chez *Gastrolobium bilobium :* 1 mg/g ! L'existence du fluoroacétate comme produit du règne végétal explique sans doute la présence dans les micro-organismes des outils pour le dégrader.

La **déshalogénation du fluoroacétate** a été décrite en détail chez un *Moraxella*, souche B. On y trouve deux haloacide déshalogénases désignées par H-1 et H-2. L'action prédominante de la première est sur le fluoroacétate, alors que la seconde

---

10 - *Une enzyme lyophilisée conserve toujours des molécules d'eau de constitution faisant partie de la structure protéique et des molécules très fermement liées. Certaines enzymes peuvent fonctionner dans un milieu organique renfermant une faible teneur en eau, de préférence dans un solvant peu miscible à l'eau comme l'heptane. Dans le cas contraire (alcool, acétone), le solvant organique a un fort effet dénaturant car il tend à "déshabiller" la protéine des molécules d'eau nécessaires à son intégrité. L'expérience tirée de* LIU *et coll. (1994) est intéressante tout en restant peu précise car il n'est pas fait état de la teneur en eau résiduelle.*

est sans effet sur celui-ci. Les deux protéines sont codées sur un même plasmide, le pUO1, mais sont distinctes et ne présentent aucune homologie entre elles. Cependant H-1 ressemble à des hydrolases de *Pseudomonas putida*, qui renferme un plasmide pUO2 très similaire au précédent, et à l'alcane déshalogénase de *Xanthobacter* **[100]**. On a l'impression qu'une fois de plus l'information génétique a été transmise horizontalement entre espèces par le jeu de plasmides et de transposons.

Le fonctionnement de la fluoroacétate déshalogénase H-1 de *Moraxella* est considéré comme fondé sur le même principe que dans l'enzyme de *Xanthobacter*, utilisant la catalyse acide-base par un site nucléophile (Asp) et un résidu basique (His) **[101]**. Le modèle est représenté par le schéma :

Défluoration du fluoroacétate

Le nucléophile a été identifié par l'usage de l'eau marquée avec l'oxygène-18 et par la spectrométrie de masse, comme expliqué précédemment. Le nucléophile qui est un aspartate est le premier à se marquer. Le caractère essentiel de l'aspartate et de l'histidine dans ce mécanisme a été vérifié par mutagenèse.

Maintenant que nous avons une idée sur le mode de dégradation du fluoroacétate, voici pour finir une application pratique possible. Nous nous souvenons du caractère toxique du fluoroacétate présent dans certaines plantes. L'inconvénient existe pour le bétail et peut diminuer la productivité du cheptel ! Il s'agit donc d'introduire dans une bactérie du rumen l'information génétique nécessaire pour dégrader le poison. Ceci a été réalisé par clonage du gène de H-1 (*Moraxella*) accompagné du promoteur *ad hoc* dans un plasmide de *Butyrivibrio fibrisolvens*, une espèce qui contribue comme son nom l'indique à liquéfier les fibres végétales par fermentation. Une expression de l'enzyme à taux élevé a été réussie **[102]**, et le plasmide avait l'élégance de ne pas s'éliminer spontanément des cellules hôtes. L'objectif s'est donc avéré parfaitement réalisable. Des applications se développent tirant profit des déshalogénases. Elles s'adressent au traitement des eaux et à la fabrication de molécules chirales utilisées comme intermédiaires de synthèse **[103]**.

CONCLUSION

Il a été évident tout au long des rubriques examinées ici que les potentialités d'élimination par les bactéries de substances artificielles sont immenses, car elles s'appuyent sur des outils qui étaient présents dans la nature bien avant que

l'homme existe et portaient sur l'élimination de substances naturelles. Le problème particulier des épandages pétroliers et des marées noires cristallise à juste titre l'inquiétude publique. Bien que les outils naturels aient pu venir à notre secours, il est certain qu'ils ne suffiront pas pour nous protéger des pollutions pétrolières, vu les énormes quantités pompées et transportées sur la planète. C'est certainement un des aspects de la pollution où l'action politique et juridique doit être renforcée énergiquement de toute urgence.

RÉFÉRENCES

[1] DENNIS M & KOLATTUKUDY PE (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89** : 5306-5310.

[2] REED JR, VANDERWEL D, CHOI S, POMONIS JG, REITZ RC & BLOMQUIST GJ (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 10000-10004.

[3] PRINCE RC (1993) *Critical Reviews Microbiol.* **19** : 217-242 ;
SWANNELL RPJ *et al.* (1996) *Microbiol. Reviews* **60** : 342-365.

[4] IQBAL S, KHALID ZM & MALIK KA (1995) *Lett. Appl. Microbiol* **21** : 176-179.

[5] SIKKEMA J, DE BONT JAM & POOLMAN B (1995) *Microbiol. Reviews* **59** : 201-222.

[6] LAUBIER L & ALZIEU C (2002) *La Recherche* **355** : 74-77.

[7] BRITTON LN (1984) *In "Microbial Degradation of Organic Compounds"*, GIBSON DT ed., Marcel Dekker.

[8] SORKHOH NA, AL-HASAN RH, KHANAFER M & RADWAN SS (1995) *J. Appl. Bacteriol.* **78** : 194-199.

[9] REILING HE, THANEI-WYSS U, GUERRA-SANTOS LH, HIRT R, KAPPELI O & FIECHTER A (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **51** : 985-989.

[10] KOCH AK, KAPPELI O, FIECHTER A & REISER J (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 4212-4219.

[11] JENNY K, KAPPELI O & FIECHTER A (1991) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36** : 5-13.

[12] KAPPELI O & FINNERTY WR (1979) *J. Bacteriol.* **140** : 707-712.

[13] GILEWICZ M, ZACEK M, BERTRAND JC & AZOULAY E (1979) *Can. J. Microbiol.* **25** : 201-206.

[14] KAPPELI O (1986) *Microbiol. Reviews* **50** : 244-258.

[15] SCHELLER U, ZIMMER T, BECHER D, SCHAUER F & SCHUNCK WH (1998) *J. Biol. Chem.* **273** : 32528-32534.

[16] KAPPELI O, WALTHER P, MUELLER M & FIECHTER A (1984) *Arch. Microbiol.* **138** : 279-282.

[17] KAMASAWA N, OHTSUKA I, KAMADA Y, UEDA M, TANAKA A & OSUMI M (1996) *Cell. Struct. Funct.* **21** : 117-122 ;
OHKUMA M, PARK SM, ZIMMER T, MENZEL R, VOGEL F, SCHUNCK WH, OHTA A & TAKAGI M (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1236** : 163-169.

[18] SANGLARD D, KAPPELI O & FIECHTER A (1984) *J. Bacteriol.* **157** : 297-302 ;
IMAJO T, KAWACHI H, ATOMI H, SANUKI S, YAMAMOTO S, UEDA M & TANAKA A (1997) *Arch. Microbiol.* **168** : 389-395 ;
UEDA M, KAWACHI H, ATOMI H & TANAKA A (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1397 : **213**-222.

[19] OHKUMA M, ZIMMER T, IIDA T, SCHUNCK WH, OHTA A & TAKAGI M (1998) *J. Biol. Chem.* **273** : 3948-3953.

[20] SCHAEFFER TL, CANTWELL SG, BROWN JL, WATT DS & FALL RR (1979) *Appl. Environ. Microbiol.* **38** : 742-746.

[21] NIEBOER M, KINGMA J & WITHOLT B (1993) *Mol. Microbiol.* **8** : 1039-1051.

[22] SHANKLIN J, ACHIM C, SCHMIDT H, FOX BG & MUNCK E (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** : 2981-2986.

[23] VAN BEILEN JB, WUBBOLTS MG & WITHOLT B (1994) *Biodegradation* **5** : 161-174 ; VAN BEILEN JB, EGGINK G, ENEQUIST H, BOS R & WITHOLT B (1992) *Mol. Microbiol.* **6** : 3121-3136.

[24] CHEN Q, JANSSEN DB & WITHOLT B (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 5508-5512.

[25] LEE HJ, BASRAN J & SCRUTTON NS (1998) *Biochemistry* **37** : 15513-15522.

[26] EGGINK G, LAGEVEEN RG, ALTENBURG B & WITHOLT B (1987) *J. Biol. Chem.* **262** : 17712-17718.

[27] STAIJEN IE, MARCIONELLI R & WITHOLT B (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 1610-1616 ; STAIJEN IE,VAN BEILEN JB & WITHOLT B (2000) *Eur. J. Biochem.* **267** : 1957-1965.

[28] SOLANO-SERENA F, MARCHAL R, LEBEAULT JM & VANDECASTEELE JP (2000) *Biodegradation* **11** : 29-35 ; SOLANO-SERENA F, MARCHAL R, HUET T, LEBEAULT JM, VANDECASTEELE JP (2000) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54** : 121-125 .

[29] WHYTE LG, HAWARI J, ZHOU E, BOURBONNIÈRE L, INNISS WE & GREER CW (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 2578-2584.

[30] WHYTE LG, SMITS TH, LABBE D, WITHOLT B, GREER CW & VAN BEILEN JB (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 5933-5942.

[31] SOLANO-SERENA F, MARCHAL R, CARASÉGOLA S, VASNIER C, LEBEAULT JM & VANDECASTEELE JP (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 2392-2399.

[32] CLARK DD, ALLEN JR & ENSIGN SA (2000) *Biochemistry* **39** : 1294-1304.

[33] KRUM JG & ENSIGN SA (2001) J. Bacteriol. **183** : 2172-2177.

[34] PURWANTINI E & DANIELS L (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 2212-2219 ; VORHOLT JA, CHISTOSERDOVA L, STOLYAR SM, THAUER RK & LIDSTROM ME (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 5750-5757.

[35] BONSEN PPM, SPUDICH JA, NELSON DL & KORNBERG DL (1969) *J. Bacteriol.* **98** : 62-68.

[36] FRALICK JA (1996) *J. Bacteriol.* 178 : 5803-5805 ; AONO R, TSUKAGOSHI N & YAMAMOTO M (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 938-944.

[37] WHITE DG, GOLDMAN JD, DEMPLE B & LEVY SB (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 6122-6126.

[38] SHENG D, BALLOU DP & MASSEY V (2001) *Biochemistry* **40** : 11156-11167.

[39] ZIMMERMANN PR, CHATFIELD RB, FISHMAN J, CRUTZEN PJ & HANST PL (1978) *Geophys. Res. Lett.* **5** : 679-682.

[40] POULOS TL & RAAG R (1992) *FASEB J.* **6** : 674-679.

[41] WESTLAKE AC, HARFORD-CROSS CF, DONOVAN J & WONG LL (1999) *Eur. J. Biochem.* **265** : 929-935.

[42] ATKINS WM & SLIGAR SG (1988) *Biochemistry* **27** : 1610-1616.

[43] JOO H, LIN Z & ARNOLD FH (1999) *Nature* **399** : 670-673.

[44] RAAG R & POULOS TL (1991) *Biochemistry* **30** : 2674-2684.

[45] SCHLICHTING I, JUNG C & SCHULZE H (1997) *FEBS Lett .* 415 : 253-257.

[46] WHITE RE, MCCARTHY M-B, EGEBERG KD & SLIGAR SG (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **228** : 493-502.

[47] ZHANG Z, SIBBESEN O, JOHNSON RA & ORTIZ DE MONTELLANO PR (1998) *Bioorg. Med. Chem.* **6** : 1501-1508.

[48] SHIMADA H, NAGANO S, ARIGA Y, UNNO M, EGAWA T, HISHIKI T, ISHIMURA Y, MASUYA F, OBATA T & HORI H (1999) *J. Biol. Chem.* **274** : 9363-9369.

[49] PETERSON JA, LU JY, GEISSELSODER J, GRAHAM-LORENCE S, CARMONA C, WITNEY F & LORENCE MC (1992) *J. Biol. Chem.* **267** : 14193-14203 ;
ANDERSSON LA, JOHNSON AK & PETERSON JA (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **345** : 79-87.

[50] LEFEVER MR & WACKETT LP (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201** : 373-378.

[51] ENGLAND PA, HARFORD-CROSS CF, STEVENSON JA, ROUCH DA & WONG LL (1998) *FEBS Lett.* **424** : 271-274.

[52] HUR HG, SADOWSKY MJ & WACKETT LP (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 4148-4154.

[53] O'KEEFE DP & HARDER PA (1991) *Molecular Microbiol.* **5** : 2099-2105.

[54] DARDAS A, GAL D, BARRELLE M, SAURET-IGNAZI G, STERJIADES R & PELMONT J (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 236 : 585-592 ;
SUTHERLAND JB (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **52** : 98-100 ;
SAURET-IGNAZI G, DARDAS A & PELMONT J (1988) *Biochimie* **70** : 1385-1395.

[55] NARHI LO & FULCO AJ (1986) *J. Biol. Chem.* **261** : 7160-7169.

[56] JONES JP, O'HARRE EJ & WONG LL (2001) *Eur. J. Biochem.* **268** : 1460-1467.

[57] AECKERSBERG F, BAK F & WIDDEL F (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 156, 5-14 ;
AECKERSBERG F, RAINEY FA & WIDDEL F (1998) *Arch. Microbiol.* **170** : 361-369.

[58] EHRENREICH P, BEHRENDS A, HARDER J & WIDDEL F (2000) *Arch. Microbiol.* 173 : 58-664 ;
SO CM & YOUNG LY (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 5532-5540.

[59] ZENGLER K, RICHNOW HH, ROSSELLÓ-MORA R,MICHAELIS W & WIDDEL F (1999) *Nature* 401 : 266-269 ;
ANDERSON RT & LOVLEY DR (2000) *Nature* **404** : 722-723.

[60] KROPP KG, DAVIDOVA IA & SUFLITA JM (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 5393-5398.

[61] GRIEG LM & SUFLITA JB (2002) *Env. Sci. Technol.* **36** : 3755-3762.

[62] WILKES H, RABUS R, FISCHER T, ARMSTROFF A, BEHRENDS A & WIDDEL F (2002) *Arch. Microbiol.* **177** : 235-243.

[63] DANGEL W, TSCHECH A & FUCHS G (1988) *Arch. Microbiol.* **150** : 358-362 ;
DANGEL W, TSCHECH A & FUCHS G (1988) *Arch. Microbiol.* **152** : 271-279.

[64] LANGE CC & WACKETT LP (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 3858-3865.

[65] ZYLSTRA GJ, WACKETT LP & GIBSON DT. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55** ; 3162-3166 ;
SHIELDS MS, MONTGOMERY SO, CUSKEY SM, CHAPMAN PJ & PRITCHARD PH (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1935-1941.

[66] WACKETT LP, HOUSEHOLDER SR, STRUIJS J & ROGERS JE(1989) *Appl. Environ. Microbiol*. **55** : 2723-2725.

[67] JAHNG D & WOOD TK (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 2473-2482 ;
FITCH MW, SPEITEL GE & GEORGIOU G (1996) *Applied. Environ. Microbiol*. **62** : 1124-1128.

[68] ARCIERO D, VANNELLI T, LOGAN M & HOOPER AB (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159** : 640-643.

[69] HOLLIGER C, HAHN D, HARMSEN H, LUDWIG W, SCHUMACHER W, TINDALL B, VAZQUEZ F, WEISS N & ZEHNDER AJ (1998) *Arch. Microbiol.* **169** : 313-321.

[70] NEUMANN A, SCHOLZ-MURAMATSU H & DIEKERT G (1994) *Arch. Microbiol.* 162 : 295-301.

[71] TERZENBACH DP & BLAUT M (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* **123** : 213-218.

[72] WACKETT LP, BRUSSEAU GA, HOUSEHOLDER SR & HANSON RS (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 2960-2964.

[73] VANNELLI T, LOGAN M, ARCIERO DM & HOOPER AB (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 1169-1171.

[74] RASCHE ME, HICKS RE, HYMAN MR, ARP DJ (1990) *J. Bacteriol.* **172** : 5368-5373.

[75] NEUMANN A, WOHLFART G, DIEKERT G (1996) *J. Biol. Chem.* **271** : 16515-16519.

[76] MILLER E, WOHLFART G & DIEKERT G (1998) *Arch. Microbiol.* **169** : 497-502.

[77] NEUMANN A, WOHLFART G & DIEKERT G (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 4140-4145.

[78] SCHUMACHER W & HOLLIGER C (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 2328-2333 ;
SCHUMACHER W, HOLLIGER C, ZEHNDER AJ & HAGEN WR (1997) *FEBS Lett.* **409** : 421-425.

[79] MAYMO-GATELL X, CHIEN Y-T, GOSSETT JM & ZINDER SH (1997) *Science* **276** : 1568-1571.

[80] CRIDDLE CS, DEWITT JT & MCCARTY PL (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 3247-3254.

[81] FATHEPURE BZ & BOYD SA (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 2976-2980 ;
EGLI C, SCHOLTZ R, COOK AM & LEISINGER T (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* **43** : 257-261 ;
LEWIS TA & CRAWFORD RL (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 1635-1641.

[82] MOHN WW & TIEJE JM (1991) *Arch. Microbiol.* **157** : 1-6.

[83] VERSCHUEREN KHG, FRANKEN SM,ROSEBOOM HJ, KALK KH & DIJKSTRA BW (1993) *J. Mol. Biol.* **232** : 856-872 ;
SCHANSTRA JP, KINGMA J & JANSSEN DB (1996) *J. Biol. Chem.* **271** : 14747-14753.

[84] JANSSEN DB, SCHEPER A, DIJKHUIZEN L & WIHOLT B (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* **49** : 673-677.

[85] POELARENDS GJ, VAN HYLCKAMA JET, MARCHESI JR, FREITAS DOS SANTOS LM & JANSSEN DB (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 2052-2058.

[86] BOSMA T, KRUIZINGA E DE BRUIN EJ, POELARENDS GJ & JANSSEN DB (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 4575-4581.

[87] POELARENDS GJ, WILKENS M, LARKIN MJ, DIRK VAN ELSAS J & JANSSEN DB (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 2931-2936.

[88] HARDMAN DJ (1991) *Crit. Rev. Biotechnol.* **11** : 1-40.

[89] LIU JQ, KURIHARA T, HASAN AK, NARDI-DEI V, KOSHIKAWA H, ESAKI N & SODA K (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 2389-2393.

[90] WEIGHTMAN AJ, WEIGHTMAN AL & SLATER JH (1982) *J. Gen. Microbiol.* **128** ; 1755-1762 ;
SMITH JM, HARRISON K & COLBY J (1990) *J. Gen. Microbiol.* **136** : 881-886.

[91] THOMAS AW, TOPPING AW, SLATER JH & WEIGHTMAN AJ (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 1941-1947.

[92] LEIGH JA, SKINNER AJ & COOPER RA (1988) *FEMS Microbiol. Lett.* **49** : 353-356.

[93] VAN DER PLOEG J, VAN HALL G & JANSSEN DB (1991) *J. Bacteriol.***173** : 7925-7933 ;
NARDI-DEI V, KURIHARA T, OKANIURA T, LIU JQ & SODA K (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 3375-3380.

[94] SCHNEIDER B, MÜLLER R, FRANK R & LINGENS F (1991) *J. Bacteriol.* **173** : 1530-1535.

[95] LIU JQ, KURIHARA T, MIYAGI M, ESAKI N & SODA K (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 18309-18312.

[96] LIU JQ, KURIHARA T, MIYAGI M, TSUNASAWA S, NISHIHARA M, ESAKI N & SODA K (1997) *J. Biol. Chem.* **272** : 3363-3368.

[97] HISANO T, HATA Y, FUJII T, LIU JQ, KURIHARA T, ESAKI N & SODA K (1996) *J. Biol. Chem.* **271** : 20322-20330.

[98] LI YF, HATA Y, FUJII T, HISANO T, NISHIHARA M, KURIHARA T & ESAKI N (1998) *J. Biol. Chem.* **273** : 15035-15044.

[99] LIU JQ, KURIHARA T, HASAN AK, NARDI-DEI V, KOSHIKAWA H, ESAKI N & SODA K (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 2389-2393.

[100] KAWASAKI H, TSUDA K, MATSUSHITA I & TONOMURA K (1992) *J. Gen. Microbiol.* **138** : 1317-1323.

[101] KROOSHOF GH, KWANT EM, DAMBORSKY J, KOCA J & JANSSEN DB (1997) *Biochemistry* **36** : 9571-9580 ;
LIU JQ, KURIHARA T, ICHIYAMA S, MIYAGI M, TSUNASAWA S, KAWASAKI H, SODA K, ESAKI N (1998) *J. Biol. Chem.* **273** : 30897-30902.

[102] GREGG K, COOPER CL, SCHAFER DJ, SHARPE H, BEARD CE & ALLEN G, XU J (1994) *Biotechnology* (N Y) **12** : 1361-1365.

[103] SWANSON PE (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* **10** : 365-369.

CHAPITRE 13
HERBICIDES - PESTICIDES - RÉCALCITRANTS

Ce chapitre nous confirmera la puissance de la microflore pour éliminer des hydrocarbures pétroliers ou des composés chlorés nés de l'industrie. Nous commencerons par essayer de comprendre comment les micro-organismes aérobies éliminent les composés hydrocarbonés non aromatiques provenant du pétrole ou répandus par l'univers des plantes comme les terpènes. Les cytochromes P450 apparaissent comme des pièces essentielles pour cette action. D'autres outils effectuent aussi des biodégradations à l'abri de l'air. Ce chapitre s'intéressera à l'élimination de certains dérivés halogénés aliphatiques, qui sont bien souvent des contaminants indésirables dans l'environnement. L'activité bactérienne capable de les faire disparaître apparaît alors comme d'autant plus précieuse.

13 – Herbicides - Pesticides - Récalcitrants

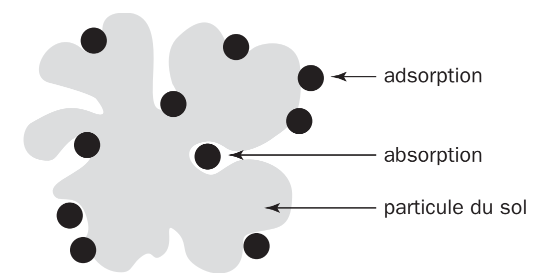
13.1 - Quelques aspects généraux

Le terme de pesticide désigne ordinairement toutes les substances ou préparations destinées à détruire les espèces animales et végétales nuisibles aux cultures. Dans la pratique, on distingue des insecticides, acaricides, nématicides, fongicides, herbicides… On estime que la bagatelle de 2,5 millions de tonnes de pesticides sont appliqués chaque année sur toute la planète. Les spécialistes craignent que les produits utilisés n'atteignent véritablement leur cible qu'à 0,3% au maximum. Cela veut dire que plus de 99% partent dans l'environnement, ce qui donne l'ampleur du problème **[1]**. Certains ingrédients sont toxiques à des taux divers, d'autres sont très rémanents. La législation de chaque pays tend à contrôler l'utilisation des nombreuses préparations mises sur le marché, voire à en interdire certaines. Une liste exhaustive des pesticides dont on connaît de façon détaillée la biodégradation serait ici complètement hors de portée. La mise au point de substances artificielles actives dans la destruction des mauvaises herbes ou des insectes parasites de l'agriculture a été stimulée à la fois par la recherche du profit et des considérations humanitaires, dont l'ambition était de lutter contre la faim et la maladie dans le monde. Depuis de nombreuses années, on s'inquiète à juste titre des effets pervers exercés sur la flore et la faune par l'épandage en grande quantité des herbicides et insecticides, notamment pour l'agriculture à haut rendement. La mise au point de plantes cultivées génétiquement modifiées, les fameux OGM, n'a fait qu'exacerber les polémiques et a catalysé une plus grande prise de conscience.

Comme la présence de pesticides dans le sol, les eaux de boissons et les produits alimentaires fait courir des risques grandissants à la santé des personnes et des animaux, une directive de la CEE en 1985 a fixé à 0,1 µg par litre la limite tolérable pour tout pesticide donné dans l'eau, et à 5 µg par litre la teneur totale des pesticides en mélange. Ce sont des limites forfaitaires, qui ne peuvent prendre en compte la diversité des cas individuels. Les contrôles s'étant multipliés, il a fallu mettre au point des techniques suffisamment sensibles pour détecter ces substances à taux faible. Chromatographie en phase gazeuse et HPLC sont des méthodes précises et sensibles, mais onéreuses et difficiles à adapter sur le terrain. Les méthodes immuno-enzymatiques permettent la construction de "kits" pour des mesures efficaces. Un pesticide à rechercher est couplé à une macromolécule comme l'albumine. L'antigène ainsi conjugué sert à diriger la production d'anticorps

capables de reconnaître les constituants à faible masse moléculaire présents à l'état de conjugués. Ces anticorps servent alors d'agents de détection dans des immuno-dosages de type *ELISA**. Des coffrets pour mesures rapides ont été mis sur le marché afin de faire des évaluations sur le terrain. Mais les grandes quantités de pesticides utilisés pour la culture provoquent une contamination alarmante des rivières et nappes phréatiques, et appellent à une surveillance accrue. Elles incitent au resserrement des dispositions légales.

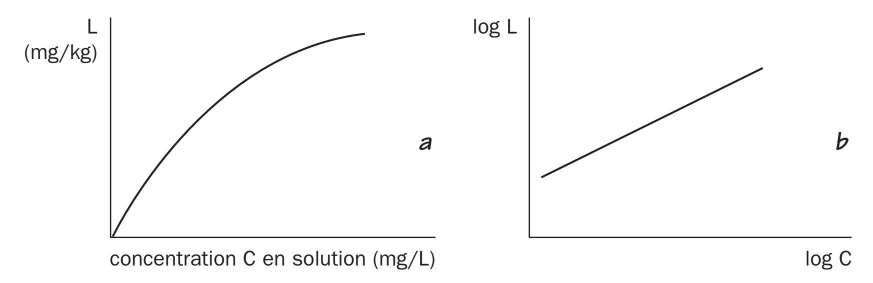
Les éléments du sol exercent une profonde influence sur les transformations chimiques qui s'y déroulent. Le milieu est extrêmement hétérogène, variable d'un lieu à un autre, et renferme des minéraux à l'état divisé, argiles, de l'humus et des matières organiques en décomposition. Les **argiles** et **micas**, dont quelques caractères généraux sont donnés en glossaire, sont des éléments importants pour retenir les substances dissoutes. Les argiles ont en même temps des pôles hydrophobes et un caractère ionique leur donnant les propriétés d'un échangeur d'ions. Lorsque le contaminant est entraîné par un courant de liquide, le phénomène a pour effet de retarder sa migration par rapport à la phase mobile, d'une manière comparable à ce qui se passe dans une chromatographie, mais en plus compliqué puisque la phase fixe est faite de particules très hétérogènes **[2]**.



Adsorption d'un soluté en surface d'une particule et absorption à l'intérieur sont deux phénomènes qui n'ont pas de frontière très tranchée entre eux. Dans les deux cas, l'association dépend du caractère soluble du contaminant, de sa masse moléculaire, de sa charge ionique ou de son hydrophobicité. On utilise volontiers le terme général de **sorption** pour désigner l'association du contaminant avec une particule solide

L'action des composants minéraux comme les argiles est secondée par l'**humus**. Une fraction de celui-ci est soumise à un renouvellement extrêmement lent et sa composition est très hétérogène. Cependant il est loin d'être inerte chimiquement et ses vertus sont mises à profit dans des oxydations biologiques imparfaitement connues, mais qui paraissent très importantes. La sorption d'un pesticide dans le sol retient souvent l'attention. Elle correspond à un état d'équilibre, déterminé par une constante Kd qui est le rapport de la concentration du polluant lié à la phase fixe à sa concentration dans le milieu liquide. Cette constante a une valeur moyenne qui dépend de plusieurs facteurs, dont la taille des particules, leur nature et le pH du milieu qui intervient dans la solubilité du produit. La valité d'une notion d'équilibre en contaminant sorbé et libre en solution à température donnée est approximative, car lorsque la concentration à l'état libre C augmente, il s'établit un

phénomène de saturation des sites disponibles sur les particules, avec courbe infléchie vers un plateau comme l'indique la figure en ***a***. La partie ***b*** de la figure montre une relation logarithmique quasi linéaire entre les deux fractions fixée et soluble du polluant.



Masse liée L en fonction de la concentration C

Un contaminant peut être d'autant mieux retenu par les particules du sol qu'il est plus hydrophobe. Cette propriété s'exprime par le coefficient *Koc**. Par exemple l'Atrazine (un herbicide) a une solubilité de 33 $mg \cdot L^{-1}$, contre 40 $mg \cdot L^{-1}$ pour un insecticide d'action générale, le Diazinon. Ces deux produits ont respectivement 163 et 194 comme Koc. Par comparaison le DDT, insecticide bien connu et maintenant banni, est très peu soluble (moins de 0,004 $mg \cdot L^{-1}$), et son Koc est de 24 000. Il est donc fortement adsorbé, et de plus très rémanent car sa biodégradation est très lente **[3]**.

Les mesures de rétention dans le sol donnent une idée sur le comportement du contaminant, mais il faut tenir compte de la rapidité avec laquelle l'équilibre est atteint, et on doit tenir compte de la vitesse d'écoulement de l'eau. Lorsqu'elle est grande, l'équilibre n'a pas le temps de s'établir et le produit est plus rapidement entraîné. Beaucoup de contaminants sont volatils, et leur entraînement en profondeur diminue leur évacuation dans l'atmosphère, en particulier si le produit possède une grande densité. Comme indiqué précédemment, un entraînement lent par les eaux circulantes permet au contaminant de résider plus longtemps dans le sol et de se voir exposé à l'action des micro-organismes avant de parvenir à la nappe phréatique. Une action qui dépend de manière considérable du taux d'oxygène présent, de la présence d'autres éléments organiques, et qui rend complexe la modélisation de la biodégradation. Beaucoup de contaminations dénoncées par la presse et les spécialistes de l'environnement résultent de l'usage en quantités inconsidérées de pesticides, d'herbicides ou d'engrais favorisant la culture intensive. Cette dernière n'est pas la seule responsable, les produits mis dans le commerce à l'usage des jardins étant souvent surconsommés dans un esprit de facilité. Les doses prescrites sont souvent assez peu lisibles sur les emballages. Les mesures faites avec les godets en plastique accompagnant ces emballages sont parfois d'une imprécision telle qu'un spécialiste habitué à la vie de laboratoire aurait du mal à opérer proprement. Il y a toujours à la base le besoin d'une information meilleure et plus transparente. L'extension de l'habitat individuel et la vogue des jardins créent un marché important de produits en tout genre, allant de la

lutte contre les pucerons à l'enlèvement des mauvaises herbes. Il y a donc un risque qui n'échappe pas aux organismes de défense de l'environnement.

Des efforts intéressants sont consacrés à de nouvelles méthodes, comme l'agriculture "bio", ou l'agriculture "raisonnée". Il y a un équilibre difficile à réaliser entre les impératifs économiques, écologiques, sanitaires et politiques. Le débat est alors facilement pollué, c'est le cas de le dire, par des prises de position dogmatiques ou animées par des objectifs égoïstes. Son analyse est loin des objectifs fixés ici, centrés uniquement sur les aspects biologiques, chimiques et génétiques de la dépollution.

13.2 - DÉGRADATION D'UN HERBICIDE

Les herbicides de la famille des phénoxyacides sont très communément utilisés : ils perturbent le développement des plantes en imitant par leur l'action l'acide 3-indolacétique, l'une des principales phytohormones contrôlant la croissance. Voici quelques exemples, dont le 2,4-D et le 2,4,5-T qui sont respectivement les acides 2,4-dichlorophénoxyacétique et 2,4,5-trichlorophénoxyacétique. Le Mécoprop et le MCPB (acide 2-méthyl-4-chlorophénoxybutyrique) sont très actifs sur les dicotylédones. On les emploie au désherbage sélectif des céréales, à raison de 500-1500 g par hectare, ou pour éliminer les mauvaises herbes du gazon [1]. D'autres produits ont une action similaire Ils dérivent de l'acide benzoïque (Dicamba) ou de l'acide picolinique (Piclorame). Ce dernier agit à dose faible (50-200 g par hectare), mais a l'inconvénient d'être assez rémanent.

$O-CH_2COOH$, Cl, Cl — 2,4-D

$O-CH_2COOH$, Cl, Cl, Cl — 2,4,5-T

$H_3C-CHCOOH-O$, CH_3, Cl — Mécoprop

$O-CHC_2CHC_2CHC_2COOH$, CH_3, Cl — MCPB

Les phénoxyacétates ont été découverts en 1942 par ZIMMERMAN. Ils sont absorbés par les feuilles des plantes dicotylédones, véhiculés dans tout le végétal jusqu'aux racines, et provoquent la distorsion des tiges et le dépérissement de toute la plante. De tels produits sont dits systémiques. Ils sont en principe sans effets sur les graines ou les végétaux dormants. Des effets différentiels très nets se manifestent en fonction de la facilité de pénétration, de la vitesse de circulation dans les vaisseaux et des transformations au sein de la plante. Pour faciliter leur absorption, on a parfois recours aux sels alcalins et amines correspondants qui régénèrent l'acide dans la plante. Le MCPB a un effet retard : inactif par lui-même,

---

1 - L'entretien du gazon est très développé dans les pays anglo-saxons à climat humide ou après irrigation, pour lesquels c'est une tradition culturelle, et il est d'importance économique pour les terrains de golf ou certains parcs de loisir. Des graminées adaptées comme le ray-grass ont été sélectionnées en vue de ce marché.

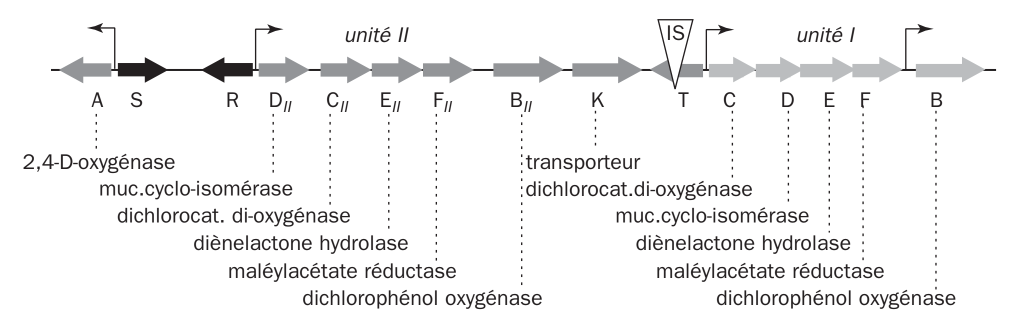
la plante le transforme en son homologue acétique après β-oxydation de la chaîne butyrique. Les plantes sont souvent capables d'exercer une détoxification de ces produits, qui peut se faire par hydroxylation du noyau et formation d'un glyco-conjugué avec du glucose.

Les phénoxyacétates dont le 2,4-D fait partie sont éliminés par plusieurs voies. En conditions aérobies, les bactéries commencent par détacher la chaîne latérale, hydroxylent le cycle jusqu'à former un catéchol, et traitent celui-ci par la voie du 3-oxoadipate. Les champignons se contentent d'hydroxyler le cycle (*Aspergillus niger*), ou le détruisent entièrement par une peroxydase (*Phanerochaete chrysosporium*). L'attaque anaérobie est moins bien connue et son principe est différent. Le chlore est enlevé par déshalogénation réductrice. Une dégradation aérobie bien analysée est offerte par *Ralstonia eutropha* JMP134 muni du **plasmide pJP4**, dont la longueur est de 85 kb. Ces bactéries peuvent se développer sur le 2,4-D, le 3-chlorobenzoate, et divers chloro-aromatiques grâce à 6 gènes essentiels qui sont sur le plasmide. L'herbicide est la cible des gènes *tfd*. Voici les deux premières étapes, qui vont nous ramener très rapidement à la voie *ortho*. La première est catalysée par une dioxygénase détentrice de Fe(II) et appartenant à une catégorie spéciale, car les deux atomes d'oxygène sont reçus par des molécules carbonées distinctes **[4]**. Dans une mono-oxygénase classique, la source d'électrons serait NADH ou NADPH au lieu de l'oxoglutarate, et il y a formation d'une molécule d'eau. L'enzyme est codé par le gène **tfdA**.

CH_2COOH – O – (Cl, Cl) | 2,4-D
O_2 — (TfdA) → | CO_2, H^+
COOH–CO–CH_2–CH_2–COOH | 2-oxoglutarate
COOH–CH_2–CH_2–COOH | succinate
OH, Cl, Cl | 2,4-dichlorophénol
+ CHO–COO^- | glyoxylate

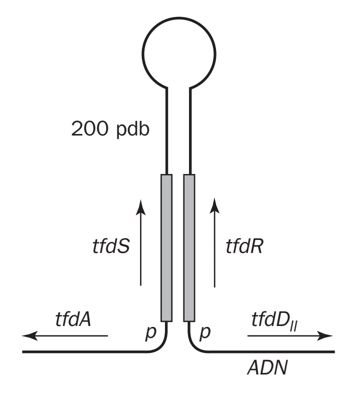
Le dichlorophénol formé est transformé à son tour par le produit du gène *tfdB*, qui est une mono-oxygénase fonctionnant comme hydroxylase productrice de 3,5-dichlorocatéchol. Il est métabolisé et déchloré jusqu'au 3-oxoadipate par la voie *ortho* modifiée comme vu antérieurement. *R. eutropha* peut ainsi se développer sur 2,4-D comme seule source de carbone et d'énergie, par conversion jusqu'au stade succinate, acétyl-coenzyme A et glyoxylate. Ces bactéries peuvent aussi se développer sur 3-chlorobenzoate. Celui-ci est transformé par une dioxygénase et une déshydrogénase en 3- et 4-chlorocatéchols, ces enzymes étant codées par le chromosome. La transformation des chlorocatéchols par la voie *ortho* modifiée est codée par le pJP4 et a été représentée dans un chapitre antérieur. On a pu voir qu'une même dioxygénase codée par *tfdC* admet comme substrats les deux chlorocatéchols et le 3,5-dichlorocatéchol. Un même opéron *tfdCDEF* (dioxygénase, cyclo-isomérase, diènelactone hydrolase, maléylacétate réductase) dirige l'expression de

toute la voie jusqu'au 3-oxoadipate. Le gène régulateur est *tfdR*. Le métabolisme de l'oxoadipate est ensuite pris en charge par des gènes chromosomiques. Les bactéries ayant reçu le plasmide pJP4 sont ainsi devenues capables de se nourrir d'un substrat difficile et entièrement artificiel, le 2,4-D. Une surprise attendait cependant les chercheurs. La portion du plasmide responsable de la biodégradation est plus longue que prévue (22 kb) et contient non pas un seul opéron *tfd* mais deux **[5]**. L'ensemble contient aussi le gène d'un transporteur (*tfdK*) et pas moins de trois gènes régulateurs : *tfdR*, *tfdS* et *tfdT* dont la disposition est symbolisée par un schéma (les longueurs relatives sont arbitraires).



Les deux unités tfdCDEF ou tfdDCEF

Les deux premiers gènes régulateurs sont les seuls fonctionnels, car *tfdT* est inactivé par la présence d'un élément d'insertion IS [**6**]. Comme *tfdR* et *tfdS* sont identiques, il est possible que la duplication qui leur a donné naissance soit un phénomène récent. Un deuxième élément d'insertion été découvert à 9 kb du premier entre *tfdS* et *tfA* **[7]**. La région *tfdR-tfdS* donne lieu à une structure curieuse. Les deux séquences identiques sont transcrites en sens inverse sur l'ADN et sont logées dans une boucle de près de 16 kb symbolisée par le dessin ci-dessous. La réalité de cette boucle a été constatée par microscopie électronique sur un fragment du plasmide. Les lettres p désignent des régions promotrices. Nous savons qu'elles sont directement en amont des régions transcrites.



Les gènes régulateurs *tfdR*, *tfdS* et *tfdT* sont placés tête-bêche par rapport aux gènes régulés et partageant avec eux la même région promotrice (petites flèches)

selon la disposition caractéristique. Les protéines régulatrices appartiennent au type LysR rencontré en examinant la voie du catéchol (CatR). Elles reconnaissent un même motif consensus et ont entre elles une similitude structurale. Voici à titre d'illustration une comparaison de séquences entre trois activateurs LysR dans la région où ils se lient à l'ADN. La disposition relative des résidus identiques (ombrés) traduit une similitude structurale et le même mode d'attachement à l'ADN.

```
TfdR –EGNVGAAARRLHISQPPVTRQIHALEQHLGVLLFERSARG–VOLTPAGAAFLEDARR–
LysR –AGSLTEAAHLLHTSQPTVSRELARFEKVIGLKLFER–VRGRLHPTVQGLRLFEEVQR–
ClcR –EGNIGAAARRLHISQPPITRQIQALEQDLGVVLFERTHRG–VPLTAAGTTFLEDARR–
```

L'unité *tfd* formant cette boucle aurait été insérée en bloc à la faveur d'une transposition venant doubler les gènes pré-existants du plasmide. Il ne s'agirait pas d'une simple duplication sur le plasmide, mais d'un apport extérieur. En effet l'ordre des gènes n'est pas tout à fait le même (inversion entre C et D), et le gène *tfdK* est un nouveau venu. C'est important parce que la protéine TfdK facilite l'entrée du 2,4-D à travers la membrane. Le gène *tfdA* fait un peu bande à part de l'autre côté et détermine la 2,4-D mono-oxygénase qui catalyse la première réaction.

En l'absence d'inducteur, ces protéines régulatrices agissent comme répresseurs et tendent à bloquer la transcription dans les deux directions. Par exemple TfdS entrave à la fois l'expression de son propre gène et celle de *tfdA* (le gène de la dioxygénase initiale). Quel est l'inducteur ? Le signal transformant TfdS en activateur de *tfdA* est le **2,4-dichloromuconate**, qui est produit à partir du 3,5-dichlorocatéchol pendant la dégradation du 2,4-D **[8]**. Le 2- ou le 3-chloromuconate agiraient dans le même sens. Puisque TfdR et TfdS sont identiques, elles sont sans doute interchangeables. Elles semblent agir pourtant plus efficacement en *cis*, c'est-à-dire sur la transcription des gènes directement adjacents, soit TfdS sur l'expression de *tfdA*, et TfdR de l'autre côté de la boucle. Que se passe-t-il si on supprime la boucle apportée par insertion sur pJP4 ? Les bactéries restent alors capables de dégrader dans une certaine mesure le 3-chlorobenzoate. Le contrôle de cette action devrait revenir préférentiellement à TfdT, mais nous savons que son gène a été inactivé par l'insertion. Les deux protéines TfdR et TfdS viendraient compenser cette perte en agissant en *trans*, c'est-à-dire au-dehors de leur site préféré.

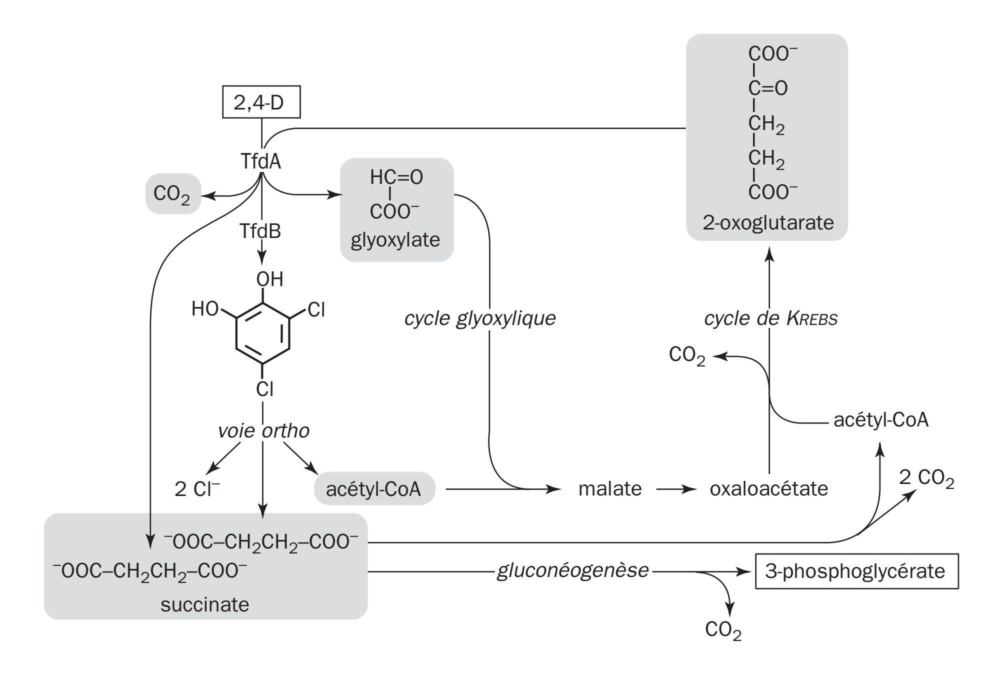
L'addition de 2,4-D à une culture continue de *R. eutropha* sur fructose provoque une cascade d'évènements que LEVEAU et coll. ont tenté d'analyser **[9]**. Ces auteurs ont mis en évidence l'augmentation des ARN messagers spécifiques détectés par hybridation au cours d'une phase d'adaptation qui dure une à deux heures. Les cellules en absence de 2,4-D ont une faible activité de base (TfdA, TfdB, TfdC) sans laquelle elles ne pourraient pas fabriquer l'inducteur en temps voulu. Après addition du 2,4-D, la montée du 2,4-dichloromuconate déclenche alors les différentes transcriptions qui apparaissent au cours du temps en fonction de l'ordre dans lequel les différents gènes sont disposés : *tfdA*, $tfdD_{II}$ et *tfdC* placés au voisinage d'un promoteur sont transcrits les premiers, tandis que *tfdB* et *tfdK* le sont plus tardivement.

Ces problèmes donnent lieu à un commentaire d'intérêt général. La période d'adaptation qui suit l'apport d'un inducteur obéit à une cinétique difficile à analyser sur le plan expérimental. La transcription des gènes successifs donne une idée sur la marche des opérations au cours de l'induction, mais ne renseigne pas sur l'intensité de chaque étape du métabolisme, car il n'y a pas nécessairement proportionnalité entre le taux d'ARN messager pour une enzyme donnée et l'activité globale de celle-ci. Supposons qu'une étape s'avère peu efficace sur le plan de la catalyse par rapport à d'autres. Elle peut créer un goulot d'étranglement dans le processus total et limiter la vitesse de l'ensemble. C'est peut-être l'un des avantages de la présence des enzymes en double, comme ici avec les deux séries *tfd*. Les enzymes ne sont pas identiques d'une série à l'autre, ne sont pas régulées exactement de la même façon, et ne fonctionnent pas au même taux. Néanmoins chaque enzyme opérationnelle peut compenser à un instant donné la déficience de son homologue. On pourrait évidemment doser chaque enzyme dans la culture bactérienne après induction. Ce travail n'est pas commode dans la pratique, car les dosages avec les cellules entières souffrent d'interférences et de complications causées par des phénomènes de perméabilité. L'abondance des artefacts viendrait ruiner la précision des analyses. Enfin des effets très compliqués sont causés par la toxicité de certains intermédiaires métaboliques comme le dichlorocatéchol, qui est un agent découplant au niveau de la membrane et lèse l'économie énergétique des cellules dès qu'il s'accumule. Si sa formation est plus rapide que sa consommation en aval, il y aura fatalement des effets toxiques qui seront éventuellement amplifiés et amèneront des résultats peu reproductibles.

Le métabolisme de l'herbicide 2,4-D est un cas de figure exemplaire, où on peut voir comment des bactéries du sol se sont équipées pour dégrader un composé purement artificiel en remaniant leur matériel génétique et leurs régulations. La pression sélective a favorisé des cellules les mieux pourvues au hasard, croit-on, des mutations et recombinaisons génétiques. Le plasmide pJP4 n'est peut-être pas l'outil idéal pour dégrader le 2,4-D dans la nature, mais les bactéries qui ont les bonnes chaussures à leurs pieds vont un peu plus vite que les autres, la seule chose qui compte finalement dans la compétition vitale. Les bactéries capables d'attaquer le 2,4-D et les divers phényl-alcanoates paraissent répandues dans la nature, notamment chez les protéobactéries de la sous-classe bêta **[10]**. La recherche systématique peut s'effectuer par la détection des séquences nucléiques *tfdA*, *tfdB*, *tfdC*, mais on risque alors de passer à côté des formes bactériennes qui emploient des oxygénases d'un autre type **[11]**. Pourtant certaines espèces bactériennes déjà pourvues des enzymes citées ici restent incapables de se développer sur le 2,4-D et herbicides de la même famille. Pourquoi ?

Le mécanisme courant fait appel à une dioxygénase utilisant le **2,4-D et le 2-oxoglutarate**. Ce dernier est un intermédiaire du cycle de KREBS et figure comme précurseur dans plusieurs synthèses (pour mémoire : glutamate, glutamine, proline, arginine). L'oxygénase le décarboxyle en succinate, une autre source de carbone intéressante pour le métabolisme. Les bactéries ne peuvent s'en tirer ici qu'en régénérant d'une façon ou d'une autre leur oxoglutarate, sans lequel l'attaque du 2,4-D s'arrêterait. Le schéma aide à comprendre comment peut s'effectuer ce re-

tour. Un mécanisme essentiel est le cycle du *glyoxylate**, et les conséquences théoriques de ce système ont été évaluées récemment par MÜLLER ET BABEL **[12]**.



Le 2,4-D est dégradé par la dioxygénase TfdA et par TfdB en 3,5-dichlorocatéchol, qui est transformé à son tour en succinate et acétyl-CoA par la voie *ortho*. Pour que les cellules puissent se développer sur l'herbicide comme seule source de carbone et d'énergie, il faut qu'une partie du carbone soit assimilée, en conduisant par exemple au 3-phosphoglycérate, et produire suffisamment d'énergie ATP pour faire fonctionner les synthèses et la maintenance cellulaires. Des 13 atomes de carbone du 2,4-D et du 2-oxoglutarate, 8 sont récupérés en succinate, 4 dans le glyoxylate et l'acétyle, 1 comme CO_2. La régénération de l'oxoglutarate (5 atomes de C) s'effectue à partir du succinate et du cycle du glyoxylate. Finalement l'excédent utilisé pour les synthèses cellulaires, représenté par le phosphoglycérate, ne représente que 3 atomes de carbone sur les 8 du substrat initial, la différence étant sous forme de 5 molécules de CO_2. Il y a donc beaucoup de pertes carbonées en cours de route, mais les oxydations produisent de l'énergie. Pourquoi un système aussi compliqué fondé sur l'utilisation du 2-oxoglutarate ? Une transformation du 2,4-D par mono-oxygénase utilisant le NADH donneur d'électrons à la place de l'oxoglutarate ne serait-elle pas plus simple et plus avantageuse ? Les calculs suggèrent que l'efficacité estimée serait à peu près la même. Il y aurait moins de pertes carbonées mais aussi moins d'énergie produite.

Cette discussion sommaire est révélatrice des problèmes métaboliques liés à de nombreuses biodégradations. Nous voyons qu'il ne suffit pas d'avoir les bonnes enzymes et les bonnes régulations, mais comme dans l'industrie un bilan énergétique et financier équilibré. Bien entendu ce n'est pas toujours le cas. Des bactéries munies de TfdA et TfdB mais incapables de régénérer correctement leur

2-oxoglutarate finissent par accumuler le dichlorocatéchol, s'intoxiquent éventuellement et ne peuvent croître sur 2,4-D. Seule solution, éventuellement : le cométabolisme. En consommant parallèlement une autre source carbonée, les bactéries peuvent compenser leur déficit et dégrader le 2,4-D de manière plus ou moins incomplète. Comme quoi il est toujours préférable de diversifier ses activités. On conçoit aisément que les micro-organismes viennent à notre secours pour dépolluer les sols contaminés par les chlorophénoxyacétates, mais une observation intéressante a été publiée par des auteurs italiens **[13]** : le 2,4-D marqué au carbone-13 est scindé non enzymatiquement en dichlorophénol et acétate par l'humus. Cette action se fait à pH neutre, elle est inhibée à pH acide ou par une peroxydase. Elle s'interprète comme une réaction radicalaire favorisée par la nature des substances humiques. L'intervention des substances humiques dans un processus de dégradation est donc à nouveau une perspective à creuser. L'avenir dira si cette observation est exceptionnelle, ou au contraire applicable à d'autres polluants.

13.3 - DES HERBICIDES CHLORÉS

De nombreux herbicides chlorés autres que les phytohormones de la série du 2,4-D ont été mis sur le marché. La priorité a été donnée en général aux études de toxicité, de rémanence et de mobilité dans les milieux naturels, mais les données manquent bien souvent sur le métabolisme par les plantes ou les micro-organismes. Les herbicides de la famille des **chloroacétamides** (Alachlor, Metolachlor, Propachlor) sont des inhibiteurs de germination. Un de leurs modes d'action est de bloquer la synthèse des acides gras à longue chaîne **[14]**.

Cl O N O Alachlor

Cl O N O Metolachlor

Cl O N Propachlor

Chloroacétamides

Le métabolisme de ces herbicides a mis en lumière l'intervention du **glutathion** (GSH) dans les biodégradations. Plusieurs auteurs avaient remarqué l'abondance de la glutathion S-transférase dans de nombreuses espèces bactériennes se multipliant au voisinage immédiat des racines végétales, c'est-à-dire dans la rhizosphère. Cette enzyme se rencontre aussi chez les champignons et les protozoaires **[15]**. Le glutathion forme des conjugués avec une foule de composés électrophiles. Cette réaction constitue un des principaux modes de détoxification chez les mammifères, et les plantes s'en servent pour neutraliser d'assez nombreux herbicides dans leurs tissus. Ce mode de liaison a été observé dans le métabolisme des chloroacétamides par les germes du sol, et montré pour la première fois sur le Propachlor [**16**]. L'enzyme clé est la γ-glutamyl transférase qui

soude le GSH au substrat avec départ du chlore. La recherche systématique de l'enzyme avec le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) a montré qu'elle était présente dans le colibacille, *Proteus mirabilis* et plus d'une vingtaine d'espèces **[17]**. Le procédé mis en œuvre est assez particulier. Le tripeptide est rogné successivement aux deux bouts pour ne laisser que la cystéine soudée au substrat. La liaison du substrat déjà déchloré avec le thiol sera rompue par oxydation. Ce procédé a été démontré pour l'Alachlor et le Propachlor.

Conjugué du CDNB avec le glutathion

Voici comment le Propachlor après la perte de son atome de chlore serait minéralisé par un *Acinetobacter* (voie **1**) et un *Pseudomonas* (voie **2**) capables de se développer sur Propachlor comme seule source de carbone. Le catéchol est un intermédiaire dans les deux cas.

D'autres herbicides chlorés appartiennent à la famille des pyridiniques, le Triclopyr et ses dérivés le butoxyéthyl ester (TBEE) et le sel de triéthylamine (TEA) appelés aussi respectivement Garlon 3A et Garlon 4. Ces produits après épandage se transforment très rapidement en Triclopyr, qui pénètre dans les feuilles et les racines et agit comme une phytohormone sur les plantes à large feuilles. Ces produits ont été très utilisés pour débrousailler et désherber en milieu forestier, car ils ont tendance à rester en surface. Le Trichlopyr est réputé peu toxique. Pourtant son usage a été très vivement critiqué à cause de sa nocivité pour les abeilles. La rémanence moyenne dans les eaux est de quelques jours. Il est métabolisé par les plantes, notamment après conjugaison avec l'acide aspartique. Les micro-organismes aérobies du sol le transforment en acides organiques, en dioxyde de carbone et eau. La figure indique deux des principaux métabolites intermédiaires trouvés, le trichloropyridinol (TCP) et la trichlorométhoxypyridine (TMP). L'acide oxamique est un produit de décomposition non biologique du Trichopyr par photolyse dans l'eau.

Tichlopyr TCP TMP Acide oxamique

Les herbicides précédents n'avaient pas de chiralité, c'est-à-dire d'isomères *R* ou *S*. Un seul fait exception ici, le Metolachlor. La variété active ici est la forme *S*, tandis que le produit fabriqué par Ciba-Geigy est un racémique où les deux énantiomères sont en égale proportion. La discrimination entre molécules asymétriques est courante en biologie et donne lieu à des phénomènes de tout ou rien. Certains médicaments sont livrés sous forme de l'énantiomère actif, de façon à augmenter son efficacité et à limiter les effets secondaires. Néanmoins les synthèses asymétriques et la séparation des inverses optiques dans un racémique ont un prix de revient qui est prohibitif pour les agents chimiques industriels produits en grande quantité, comme les pesticides et herbicides. Le problème devient aigu au niveau de leur biodégradation, puisque rien n'indique *a priori* que les deux énantiomères seront éliminés à la même vitesse. De nombreuses études d'environnement se voient donc entachées d'erreur, quand l'une des formes est dégradée beaucoup plus rapidement que l'autre. Des essais ont été pratiqués par LEWIS et coll. **[18]** sous trois latitudes différentes, en Norvège, aux Etats-Unis et au Brésil. Les produits choisis sont deux herbicides, le Dichlorprop et le Méthyl-dichlorprop, ainsi qu'un insecticide, le Crufomate encore appelé Ruelène de la famille des phosphoramides. Les deux herbicides agissent comme phytohormones, à la manière du 2,4-D et du Trichlopyr. Seuls sont actifs comme herbicides les énantiomères (+). Le Crufomate est un insecticide utilisé dans les élevages de bovins, les deux énantiomères sont actifs mais le (+) est quatre fois plus toxique que l'autre.

(*R*)-(+)-dichlorprop (*S*)-(-)-dichlorprop

(*S*)-crufomate (*R*)-crufomate

De multiples échantillons ont été examinés chaque fois. Les deux isomères du Méthyl-dichlorprop sont rapidement déméthylés au même taux en Dichlorprop, les estérases bactériennes étant souvent peu sélectives. Il n'en est pas de même pour la dégradation du Dichlorprop, beaucoup plus lente et amorcée après un retard de plusieurs semaines. En comparant le sol forestier amazonien et diverses parcelles déforestées, des différences sensibles ont été constatées. Par exemple le premier type de sol avait tendance à éliminer plus rapidement l'énantiomère (+) actif

comme herbicide, contrairement aux sols des secteurs défrichés. De même la déforestation semblait privilégier l'élimination du Crufomate (–), qui est le moins toxique. Des différences ont été constatées également entre prélèvements de sol provenant des trois latitudes et les recherches ont montré une très grande variabilité entre populations microbiennes et sélectivité.

La dégradation différentielle des énantiomères d'un même produit est donc une difficulté dont il faudra tenir compte de plus en plus dans les études environnementales.

13.4 - LES ACIDES PHOSPHONIQUES - LE ROUNDUP

Ces produits sont caractérisés par une liaison directe carbone-phosphore, contrairement aux esters phosphoriques où un atome d'oxygène est intercalé. Les phosphonates d'origine biologique sont relativement rares dans la nature. On les trouve pourtant en abondance chez certains invertébrés comme une anémone de mer, chez des insectes, et surtout dans les enveloppes de micro-organismes : streptomycètes, *Trypanosoma*, *Tetrahymena* et bien d'autres. Cette catégorie de composés regroupe quelques antibiotiques dont la fosfomycine (ou Phosphonomycine). Dans les phosphonolipides, le 2-aminoéthylphosphonate (**AEPn**), ou **ciliatine**, que nous retrouverons plus loin, remplace la très classique éthanolamine-phosphate. En somme les phosphonates sont des produits naturels, stables et résistants à l'hydrolyse, auxquels se sont adaptées de nombreuses espèces de bactéries ou de champignons.

L'industrie chimique s'est emparée des phosphonates et en a répandu dans l'environnement depuis plus de trois décennies, en particulier des herbicides dont le chef de file est le **glyphosate** (N-phosphonométhylglycine). Celui-ci entre dans la composition d'un désherbant très utilisé en agriculture et répandu sous le nom de **Roundup** (*Monsanto*) [2]. Le glyphosate y est mélangé à un ammonium quaternaire prévu pour faciliter la pénétration dans les feuilles. La cible de son action est une réaction particulière dans la synthèse de la phénylalanine et de la tyrosine, catalysée par la synthase de l'EPSP (voir figure de la page suivante). L'enzyme est codée par le noyau et fonctionne dans le chloroplaste. Le glyphosate imite le shikimate-3-phosphate qui est l'un des substrats de l'enzyme, inhibe la synthèse des acides aminés aromatiques dans les plantes en cours de croissance. Le glyphosate agit comme désherbant total sur les végétaux en cours de croissance.

2 - *L'usage très souvent abusif de ce désherbant efficace cristallise les protestations des organisations écologistes, pour les raisons citées plus loin. Il en résulte une prise de conscience progressive du public pour une utilisation plus raisonnée, par exemple au cours des activités de jardinage.*

La réaction inhibée par le glyphosate

L'absorption du glyphosate par les particules du sol retarde son drainage vers les aquifères, le rendant rémanent dans le sol avec un temps de présence variable allant de quelques semaines à plus d'une année. D'après l'OMS, l'utilisation normale du glyphosate ne ferait pas faire courir de risque à la santé, mais ce point de vue est très controversé. L'emploi du glyphosate à grande échelle [3] et la pollution constatée des rivières présente une réelle menace. On accuse ces herbicides d'augmenter le taux d'apparition d'une forme de leucémie. Le glyphosate est mal éliminé par l'organisme humain. Des pollutions scandaleuses et régulières des cours d'eau ont été constatées ici et là, en particulier en Bretagne. Dans l'Elorn, une rivière qui alimente en eau potable le tiers du Finistère, le "débordement" du glyphosate y a dépassé en 1999 plus de 170 fois la norme considérée comme acceptable **[19]** ! Une lutte se poursuit sur les plans économique et politique, entre les multinationales comme la firme *Monsanto* d'une part et diverses organisations de défense qui réclament le bannissement de ces herbicides sur la base du principe de précaution. Les résultats sont embrouillés par la présence, en mélange avec l'herbicide, d'adjuvants qui ne sont pas sans effets secondaires sur l'environnement et la santé.

La rupture de la liaison C-P est l'opération essentielle pour la dégradation du glyphosate, mais elle résiste à l'acide chlorhydrique et à la soude ! Le mode d'action de l'enzyme compétente, ou C-P lyase, est mal connu. Le glyphosate serait dégradé selon deux voies. La première ou voie de la sarcosine (**1**), est pratiquée par *Enterobacter aerogenes* et la plupart des espèces bactériennes capables de faire une coupure de la liaison C–P **[20]**, selon le principe :

La **C-P lyase** libère du phosphate. La sarcosine entre facilement dans le métabolisme intermédiaire après avoir perdu un élément monocarboné qui sera pris en charge par le tétrahydrofolate (FH4) **[21]**. Une étude systématique a montré que la plupart des souches isolées à partir de sites contaminés par le glyphosate scindaient celui-ci par la voie de la sarcosine **[22]**.

3 - *Près de 24 000 tonnes avaient été utilisées aux Etats-Unis au cours de l'année 2000 d'après un rapport de l'EPA. Le Roundup est l'herbicide le plus vendu au monde, a représenté près de 2,6 milliards de dollars en chiffre d'affaire pour le groupe MONSANTO au cours de l'année 2000.*

glyphosate: $^{-}OOC-CH_2-NH-CH_2-PO_3^{2-}$

(1) H_2O, *C-P lyase* → sarcosine $^{-}OOC-CH_2-NH-CH_3$ + $HO-PO_2^{2-}$ → glycine, éléments monocarbonés

(2) → aminométhyl-phosphonate $H_2N-CH_2-PO_3^{2-}$ + unité à 2 C

aminométhyl-phosphonate —(H_2O, *phosphonatase*)→ méthylamine H_2N-CH_3 + $HO-PO_2^{2-}$

Dégradation du glyphosate

Par contre la seconde voie (**2**), notamment chez certains *Pseudomonas*, passe par le 2-aminométhyl-phosphonate (AMPA). Celui-ci est scindé par une C-P lyase comme indiqué sur le schéma, la méthylamine formée étant oxydée en NH_4^+, CO_2 et H_2O. Il semble cependant que la plupart des souches capables d'utiliser le glyphosate ne le transforment pas en AMPA. On a décrit aussi une rupture du glyphosate entre N et C du côté phosphate avec production de glycine et de formyl-phosphonate **[23]**.

La C-P lyase coupe la liaison C–P par un mécanisme d'oxydoréduction radicalaire encore imparfaitement connu (réaction ***a*** du schéma) **[24]**. Elle peut libérer du méthane à partir de méthylphosphonate, qui est le plus simple des composés organophosphoniques. La réaction ***b*** concerne plus particulièrement l'AMPA qui est scindé par une C-P lyase. La voie ***b*** opère en deux étapes, une transamination et une réaction qui ressemble à celle de la C-P lyase tout en étant distincte par son mécanisme d'hydrolyse. Cette enzyme est désignée comme **phosphonatase**.

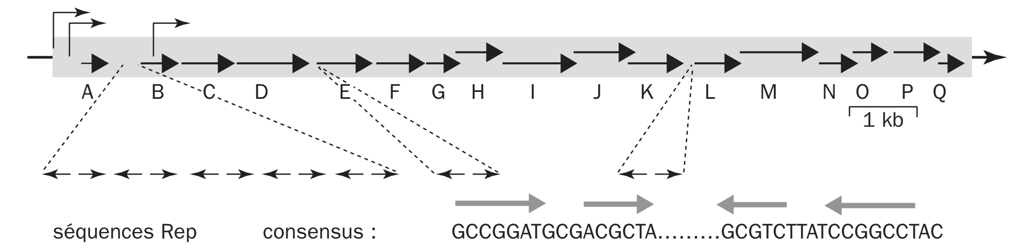
a $CH_3PO_3H_2 \xrightarrow{\text{CP-lyase}} CH_4 + HPO_3^{2-}$

méthylphosphonate → méthane + phosphite

b $H_2N{-}CH_2CH_2PO_3H_2 \longrightarrow CHO{-}CH_2PO_3H_2 \xrightarrow{\text{phosphonatase}} CHO{-}CH_3 + H_3PO_4$

2-aminoéthylphosphonate → phosphono-acétaldéhyde → acétaldéhyde + Pi

Enterobacter aerogenes et quelques espèces ont à la fois les deux voies **[25]**, alors que d'autres n'utilisent que celle de la phosphonatase. La synthèse de la C-P lyase chez *Escherichia coli* est déterminée au sein de l'opéron *phnA-Q*, qui offre une situation extraordinaire car il ne contient pas moins de 17 gènes sur un segment de 15611 pdb entièrement séquencé **[26]**. Cet ensemble impressionnant détermine un mécanisme de transport, la C-P lyase, des protéines régulatrices et des éléments accessoires, comme les facteurs responsables de l'oxydation du phosphite en phosphate. Le diagramme donne une idée de cette unité génétique.



Les 17 gènes phn chez E. coli B

On peut y relever plusieurs particularités intéressantes. L'ensemble est peut-être transcrit d'une pièce à partir de trois sites promoteurs identifiés (petites flèches coudées), mais l'existence de promoteurs secondaires n'est pas exclue. Plusieurs gènes, tels que *phnH*, *phnJ*, sont légèrement chevauchants sur les gènes voisins. Enfin les zones intergéniques, non traduites, sont très restreintes, sauf en quelques endroits où se rencontrent des séquences répétées inversées dites *Rep**. La principale est entre *phnA* et *phnB*. L'ensemble du vaste segment *phn* renferme des ORF supplémentaires de fonction non identifiée, dont la séquence est portée par le brin d'ADN complémentaire, et qui sont orientées en sens inverse. La signification individuelle de tous ces gènes a été examinée par comparaison avec des gènes connus, par complémentation de mutants et surexpression afin d'isoler la protéine correspondante. L'utilisation des phosphonates ne requiert pas la totalité des gènes de cet ensemble, mais se limite au bloc *phnC...P* (14 gènes au lieu de 17), les gènes *phnA*, *phnB* et *phnQ* n'étant pas concernés **[27]**. Le colibacille n'est pas le seul organisme à posséder une telle lyase, dont l'équivalent s'observe dans d'autres espèces (*Rhizobium meliloti*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Klebsiella* et *Arthrobacter*). Le *Rhizobium* peut même se développer sur benzylphosphonate et sur glyphosate comme seule source de phosphore, contrairement au colibacille. La C-P lyase de *Rhizobium* est peu spécifique et agit sur n'importe quel phosphonate. Les gènes sont homologues de ceux de *E. coli*.

Un appareil génétique aussi important pour attaquer les phosphonates a de quoi surprendre. Les bactéries ont besoin du bloc *phnC...P* pour avoir une C-P lyase fonctionnelle. Le méthyl-phosphonate est le substrat utilisé pour révéler la présence de la lyase membranaire, qui est codée par l'ensemble *phnGHIJKLM*. On suppose que l'enzyme est membranaire et tournée vers le périplasme de la cellule. Elle est relativement complexe, et renferme des sous-unités différentes. La partie *phnCDE* correspond à un système transporteur et *phnO* aurait une fonction régulatrice qu'on ne connaît pas exactement. La fonction des protéines codées par *phnN* et *phnP* serait de faciliter l'insertion des autres éléments dans la membrane et de les stabiliser. Tout cet arsenal ne serait pas dirigé seulement contre les phosphonates. Par exemple, le transporteur présumé codé par *phnCDE* concerne aussi les ester-phosphates, l'ion phosphate et les ester-phosphites. L'utilisation d'un phosphite comme source de P nécessite l'oxydation du phosphore de + 3 à + 5, c'est-à-dire sa transformation en phosphate. Il y a probablement un cycle d'oxydoréduction où alternent les niveaux phosphate et phosphite. C'est pourquoi la C-P lyase, qui

scinde une structure chimique passablement inerte, serait une enzyme relativement complexe car elle comporte un mécanisme fondé sur cette oxydoréduction.

Les phosphonates donneurs de phosphore ou d'azote sont rarement utilisés comme seule source de carbone, soit parce qu'ils ne pénètrent pas dans la cellule, soit parce que les bactéries n'arrivent pas à équilibrer leur métabolisme en leur présence. Le phosphate est libéré à partir des phosphonates à l'extérieur du cytoplasme et utilisé à l'intérieur après transport. Les bactéries détentrices d'une C-P lyase et d'un transport des phosphonates ne peuvent utiliser le phosphore qu'après oxydation du phosphite (HPO_3^{2-}, anion de l'acide phosphoreux) en phosphate (HPO_4^{2-}). Ceci a été mis en évidence par clonage des gènes *phn* du colibacille chez *Klebsiella aerogene,* qui peut alors utiliser divers phosphonates et le phosphite minéral comme source de phosphore **[28]**. Cette propriété est intéressante pour l'industrie où l'hypophosphite ($H_2PO_2^-$) est utilisé en grande quantité comme réducteur des ions métalliques dans la fabrication des disques compacts. Il en résulte une pollution par phosphite, dont l'oxydation biologique en phosphate est donc fort utile. *Klebsiella* excelle si bien dans la récupération du phosphore qu'elle accumule en son sein du polyphosphate. L'ensemble des gènes *phn* est soumis à induction et répression. Le dispositif est placé sous le contrôle de ***PhoR**** **[29]**, une protéine de contrôle global à la base d'un vaste régulon, dont la mission est d'approvisionner la cellule en phosphate. Deux conclusions semblent émerger. Tout d'abord la consommation des phosphonates, dont le glyphosate est un cas particulier, paraît beaucoup plus répandue dans la nature que supposé initialement. Ensuite les phosphonates sont utilisables comme source de phosphore, et même d'azote comme dans le cas du glyphosate. Leur dégradation est sous le contrôle de plusieurs gènes et implique des mécanismes de transport. La complexité de tout cet appareil vient d'un problème crucial, la récupération du phosphore, car cet élément est très souvent limitant pour la croissance des organismes dans les conditions naturelles. Le système que nous avons décrit permet aux bactéries de faire feu de tout bois pour assimiler le précieux élément.

Parmi les phosphonates naturels figure la fosfomycine (ou phosphonomycine), un antibiotique découvert chez *Streptomyces fradiae* et agissant sur une étape initiale de la synthèse des peptidoglycanes. Son effet ressemble à celui de la pénicilline, mais s'exerce autrement. Les *Penicillium* sont capables de convertir un phosphonate, le *cis*-propénylphosphonate (cPA), en fosfomycine par époxydation stéréospécifique catalysée à l'aide d'une cPA oxydase **[30]** :

époxydation →

fosfomycine

Les champignons peuvent synthétiser des composés phosphoniques et les transformer. On les suppose capables de les dégrader. En effet, la croissance de *Penicillium notatum* est possible en utilisant divers phosphonates comme seule source de phosphore **[31]**. Les substrats utilisés sont le 2-aminoéthylphosphonate (ciliatine) et

une série de composés alpha-aminés comprenant ce produit et les homologues supérieurs à chaîne carbonée plus longue. Le mécanisme d'attaque serait comparable à celui qu'utilisent les bactéries comme défense contre cet antibiotique. Un *Rhizobium huakuii* est capable d'utiliser la fosfomycine à dose élevée (10 mM) comme source de carbone, de phosphore et d'énergie **[32]**, une propriété qui semble répandue dans le genre *Rhizobium*.

On ne s'attendait pas évidemment à rencontrer l'emploi d'un système aussi complexe consacré à la dégradation des phosphonates, alors que ces derniers ne sont pas au premier plan des circuits métaboliques habituels et ont attiré l'attention après emploi d'un composé artificiel. Une très longue évolution a probablement préparé les micro-organismes à rencontrer des phosphonates : la fabrication industrielle de nouveaux phosphonates ne les aurait pas "surpris" là encore. En résumé, on a pu voir que les phosphonates ne sont finalement que des sources de phosphore parmi d'autres. Les espèces bactériennes ont développé un outillage perfectionné pour les utiliser et n'ont fait que l'employer à la biodégradation des phosphonates artificiels dont le glyphosate fait partie.

13.5 - ORGANOPHOSPHATES - PARATHION ET AUTRES

Parmi les insecticides les plus utilisés sur la planète sont des organophosphates synthétiques, dont l'action essentielle est d'inhiber les acétylcholine estérases dans les organismes cibles. Ce sont des neurotoxiques. Les organophosphates commercialisés comme insecticides paralysent le système nerveux des insectes tout en ménageant celui des vertébrés. Leur toxicité sur l'Homme n'est cependant pas nulle, et l'épandage massif de ces produits dans l'agriculture provoque des accidents. Leur caractère hydrophobe les fait s'adsorber facilement sur les sédiments (log Koc de 2 à près de 4), et la contamination de l'environnement peut devenir préoccupante. C'est pourquoi des efforts importants ont été consacrés à l'étude du transport et de l'élimination de ces produits. La figure montre des exemples courants.

Quelques organophosphates

Ces différents ingrédients ont plusieurs noms commerciaux. Par exemple le **Diazinon** s'appelle aussi Spectracil, Neocidol, Alfa-Tox, Knox-out et AG 500. Un même insecticide existe sous des conditionnements variés et s'utilise en poudre,

pulvérisation, granulés, microcapsules... Les usages diffèrent sans que les effets soient rigoureusement spécifiques. Le Diazinon est courant pour le jardin et l'agriculture, le Chlorpyrifos pour le contrôle des cafards, des puces et des termites, le Fenamifos pour lutter contre les nématodes, enfin le Parathion pour protéger les cultures. Les insecticides organophosphorés ont en commun d'avoir une liaison phosphoryle ou thiophosphoryle (P=S). Leur solubilité excède rarement 40 $mg.L^{-1}$. Les plus hydrophobes comme le Chlorpyros sont en même temps les plus volatils. Ce caractère joint à un pouvoir d'adsorption marqué sur les particules du sol limite la contamination des eaux circulantes. Tous ont tendance à s'échapper partiellement dans l'atmosphère, où ils sont soumis à des oxydations photochimiques. La plupart de ces insecticides peuvent devenir très dangereux lorsqu'ils sont utilisés sans précaution, en particulier le Fenamiphos très toxique par contact, ingestion et inhalation.

Ces insecticides agissent sur l'acétylcholine estérase comme inhibiteurs compétitifs, et ne sont donc pas transformés par l'enzyme. Une action efficace est celle d'un inhibiteur "suicide" : l'enzyme scinde alors l'insecticide en servant d'estérase, mais son site actif reste bloqué par une liaison covalente. Comme ces insecticides sont inactivés par hydrolyse, il doit exister des agents biologiques naturels qui décontaminent facilement ces produits. Les **organophosphate hydrolases** microbiennes (OPH) ont été détectées depuis plus de quinze ans. Une bactérie du sol, *Pseudomonas diminuta*, possède cette estérase qui a été purifiée **[33]**. L'effet est extrêmement variable en fonction de l'insecticide choisi pour cible, le plus rapidement hydrolysé étant le **Paraoxon**. Celui-ci se forme au cours de l'attaque du Parathion par une aryldialkyl phosphatase, avec remplacement du soufre par l'oxygène. Le Paraoxon a lui-même les propriétés d'un insecticide. Son hydrolyse fait apparaître du **4-nitrophénol**.

paraoxon — H_2O — H_2S — parathion — H_2O — 4-nitrophénol

Attaque du Parathion

Nous connaissons le métabolisme du 4-nitrophénol, lequel est facilement détecté par sa couleur jaune due à l'ion nitrophénolate. Une mono-oxygénase l'oxyde en nitrocatéchol, ou encore en *p*-benzoquinone. Celle-ci est entièrement biodégradable et conduit à la voie du 3-oxoadipate (voie *ortho*). L'enzyme clé est l'organophosphate hydrolase (OP), qui transforme directement le Parathion ou le Paraoxon en

nitrophénol. Un *Pseudomonas* transformé par un plasmide où avait été inséré le gène de l'hydrolase est devenu capable de dégrader le 4-nitrophénol et de se développer sur Parathion [**34**]. La minéralisation complète du Parathion et des autres organophosphates est réalisée par les associations bactériennes du sol, mais ce processus est assez lent. Des recherches ont eu lieu pour améliorer la vitesse de l'hydrolyse du Parathion, du Paraoxon et des composés analogues. Par chance on connaît la structure détaillée de l'hydrolase OP [**35**]. La spécificité de son action dépend de l'insertion plus ou moins favorable des divers organophosphates dans le site actif. En modifiant celui-ci par mutagenèse dirigée, on peut espérer obtenir utilement une hydrolase active sur d'autres molécules.

Une application de cette recherche est la biodégradation du **méthyl-Parathion**. L'usage de cet insecticide est très répandu dans le monde entier pour la défense des cultures de riz, du soja, du coton, du maïs, ainsi que des arbres fruitiers. Il diffère du Parathion en ayant deux groupes méthoxyles sur le phosphore au lieu d'éthoxyles. La molécule est donc plus petite, mais s'hydrolyse plus lentement que son homologue éthoxylé. La mutagenèse dirigée permet d'améliorer l'hydrolyse du méthyl-Parathion, mais cette recherche peut s'avérer très laborieuse. La méthode utilisée pour obtenir rapidement un grand nombre de mutations est celle du *DNA shuffling** ou méthode de STEMMER. Le but est ici d'obtenir rapidement de nombreux changements d'acides aminés dans le site actif, afin de modifier les performances de l'enzyme. Diverses mutations sont défavorables et ignorées. Par contre d'autres modifications améliorent les propriétés. En introduisant des résidus d'acides aminés plus encombrants dans le site, on obtient une enzyme mutante dont la préférence va au méthyl-Parathion. Cette méthodologie est assez puissante pour construire des gènes nouveaux intéressants. Par incorporation dans un plasmide transmis aux bactéries, celles-ci deviennent du même coup beaucoup plus performantes pour détruire un produit donné. En somme on reconstitue l'évolution qui s'effectue spontanément dans la nature, par mutations et sélection, mais on peut espérer obtenir le résultat à un rythme accéléré !

Les organophosphates sont-ils utilisables comme source de phosphore par les micro-organismes ? La réponse est affirmative. La détoxification hydrolytique de plusieurs organophosphates a été constatée dans une bactérie des plus banales dans les laboratoires, *E. coli* K12. La défluoration du di-isopropylfluorophosphate (DFP), dont la formule est donnée un peu plus loin, engendre l'ester di-isopropylphosphate, puis l'ester monophosphate et enfin le phosphate. Il y a en somme une déshalogénation et deux hydrolyses successives avant que les bactéries puissent utiliser le phosphate. Le nettoyage des milieux contaminés par les organophosphorés est devenu urgent depuis qu'a été reconnue la grande toxicité de bon nombre de ces produits, par exemple le Malathion utilisé dans des pays en voie de développement pour lutter contre le vecteur du paludisme. Le Parathion a été aussi le responsable d'un nombre incalculable d'accidents. Le Phosvel est un autre organophosphoré dangereux, fabriqué aux Etats-Unis où son usage est maintenant interdit, mais distribué autrefois par milliers de tonnes dans les pays du tiers-monde au titre de l'aide au développement ! Beaucoup de ces insecticides sont maintenant soumis à un usage très réglementé et sont même bannis dans de nombreux pays. La menace s'est déplacée vers les organophosphates utilisés comme

armes de guerre (gaz de combat). La marge est finalement assez étroite entre les propriétés insecticides et l'action neurologique sur l'homme par blocage de l'acétylcholine estérase. Citons le Tabun, le Sarin et le di-isopropylfluorophosphate (DFP) qui sont de puissants neurotoxiques.

Tabun Sarin Soman DFP

La crainte suscitée par ces produits a augmenté avec la menace de leur utilisation au cours de conflits armés, de répressions sauvages comme au Kurdistan ou dans des attentats terroristes. En Mars 1995, les adeptes d'une secte criminelle ont déposé du Sarin à plusieurs endroits du métro de Tokyo, tuant 11 voyageurs. Plus de cinq mille personnes furent plus ou moins gravement atteintes, avec des troubles oculaires, respiratoires ainsi que de violentes nausées. Ces produits sont volatils et extrêmement toxiques. Le DFP donne tout de même lieu a des applications pacifiques pour la recherche. C'est un excellent inhibiteur suicide des protéases à sérine, vaste famille d'enzymes dont font partie la trypsine, la chymotrypsine, des facteurs du complément sanguin et des protéases participant à l'hémostase. L'inhibition s'exerce par la formation d'une liaison covalente irréversible avec la sérine essentielle du site catalytique [4]. Le DFP est également utilisé dans certains traitements en ophtalmologie et contre la *myasthenia gravis* [5]. Une surprise nous vient d'*Escherichia coli*, qui est capable de détoxifier le DFP à l'aide d'une hydrolase, en libérant du di-isopylphosphate et du fluorure ! Les bactéries peuvent aussi hydrolyser le Paraoxon et le Soman, une tentative pour elles de récupérer le précieux phosphate. La capacité d'obtenir du phosphore par cette voie dans les différentes souches microbiennes dépend non seulement de la présence de la bonne hydrolase, mais des mécanismes de transports. La protéine PhnE de *E. coli* logée dans la membrane est l'hydrolase, mais un deuxième gène, *glpT*, commande un transport du DFP **[36]**. Nous avons donc retrouvé dans cette section un certain nombre d'aspects abordés à propos des phosphonates. L'élimination de ces produits est fondée sur leur hydrolyse. Ils agissent principalement sur l'acétylcholine estérase des insectes, mais comme la marge est étroite entre cette action spécifique et les effets toxiques sur l'homme, beaucoup de ces produits apparaissent donc comme des polluants dangereux dont la nature justifie d'importants contrats de recherche.

4 - *Un antidote doit pouvoir faire sauter la liaison entre sérine et phosphate. La Pralidoxime agit dans ce sens en formant un complexe oxime-phosphonate avec le groupe phosphorylé, le rendant labile et permettant la régénération de l'enzyme sous sa forme initiale.*

5 - *Dégénérescence des muscles squelettiques, d'origine auto-immunitaire, par blocage des neurorécepteurs de l'acétylcholine.*

13.6 - ORGANOCHLORÉS - LINDANE ET DDT

Cette section évoquera le cas de certains insecticides comme le Lindane, le DDT et le Chlordane, qui sont aussi au cœur de problèmes environnementaux, et pour certains (le DDT) de vives polémiques. Ces produits et ceux qui leurs sont apparentés symbolisent bien les contradictions modernes liées au progrès technologique. Leur usage a été interdit en France. D'un côté ils apparaissent nécessaires dans la lutte menée contre les insectes ravageurs de l'agriculture et vecteurs de maladies. Inversement leur biodégradation est lente, leur rémanence fait courir des risques sur la santé des populations et des animaux domestiques. Les pyréthroïdes sont aussi des insecticides organochlorés, mais ils offrent un cadre à part et seront examinés dans une section suivante. L'histoire du **Lindane** a commencé en 1826 quand FARADAY, un chimiste anglais, s'aperçut qu'on pouvait faire une addition massive du chlore sur le benzène à l'aide d'un excès de Cl_2 à la lumière. Le produit obtenu était l'hexachlorocyclohexane (HCH) et comportait plusieurs isomères en fonction de la configuration des 6 atomes de carbone asymétriques. C'est en 1935 aux Etats-Unis, qu'on découvrit le pouvoir insecticide du HCH. En fait seul l'isomère gamma représenté ici s'avéra être un puissant insecticide.

g-hexachlorocyclohexane

Il a été isolé par la chimiste belge VAN DER LINDEN, d'où son nom. Cet insecticide agit sur les insectes comme neurotoxique, avec un effet thermique négatif (devenant plus actif par abaissement de température). Après la deuxième guerre mondiale, les Etats-Unis entreprirent la grande production du Lindane renfermant plusieurs isomères, et il en fut fait une énorme utilisation jusqu'à ce que fut constatée l'accumulation de certains isomères particulièrement rémanents (α et β).

Après fabrication du Lindane à moindre coût au niveau technique, il y avait 5 isomères, alpha, bêta, gamma, delta et epsilon. Le gamma n'est pas optiquement actif. Il en résultait une contamination forte des plantes et des animaux. Les inconvénients sur la santé ont fait bannir ce produit de la plupart des pays développés. En outre, les préparations impures d'insecticide avait une odeur de moisi qui pouvait se communiquer aux plantes consommées. Une contamination de l'environnement persiste encore ici et là, et le Lindane est encore en usage dans certaines parties du monde à cause de son faible coût. La dégradation biologique du Lindane a fait l'objet de travaux japonais détaillés. Un *Pseudomonas*, appelé maintenant *Sphingomonas paucimobilis*, est capable de croître sur le Lindane comme seule source de carbone et d'énergie, le chlore étant éliminé sous forme de chlorure **[37]**. Les intermédiaires sont détectés et mesurés essentiellement par chromatographie en phase gazeuse. Une première voie transforme le Lindane en 2,5-DCHQ (2,5-dichlorohydroquinone) :

Voie du Lindane chez S. paucimobilis

Les crochets désignent des intermédiaires non isolés dans le milieu, et les flèches en pointillé des déchlorations spontanées en produits secondaires, le 1,2,4-trichlorobenzène et le 2,5-dichlorophénol. Les trois premières étapes jusqu'à la 2,5-DCHQ sont sous la dépendance des gènes constitutifs *linA*, *linB* et *linC*. **LinA** est une déchlorase de 17 kDa d'un type nouveau, car sa séquence n'a aucune homologie avec d'autres protéines connues, mais la part prise dans ce métabolisme a été vérifiée à l'aide d'une mutation **[38]**. Deux atomes de chlore sont enlevés, conduisant au 1,4-TCDN (1,3,4,6-tétrachloro-1,4-cyclohexadiène). **LinB** est une 1,4-TCDN chlorohydrolase qui ressemble à d'autres déshalogénases hydrolytiques. Enfin **LinC** est une déshydrogénase provoquant l'aromatisation du cycle. La dégradation ultérieure de la 2,5-dichlorohydroquinone (2,5-DCHQ) fait penser à la dégradation des phénols halogénés, mais les deux hydroxyles sont en position *para*. Il ne se forme pas un catéchol, mais une structure qu'on voit dans le gentisate. Le substrat est pris ici en charge par deux enzymes inductibles, **LinD** et **LinE**. La première est une déchlorase catalysant une oxydoréduction avec le glutathion (GSH), tandis que LinE est une dioxygénase. La protéine LinE a été exprimée chez le colibacille **[39]** et se montre capable d'oxyder l'hydroquinone presque aussi bien que la chlorohydroquinone en utilisant une quantité équivalente d'O_2 mais reste sans action sur le catéchol. La surprise vient surtout de sa séquence, qui montre une parenté quasi certaine avec les dioxygénases *méta*, tandis qu'aucune ressemblance n'a été vue avec la gentisate 1,2-dioxygénase. Les études restent incomplètes, mais ont permis de détecter la formation de maléylacétate et de 3-oxoadipate. Les dernières étapes du tableau métabolique restent donc hypothétiques.

La déchloration du Lindane peut s'effectuer dans des conditions différentes de celles qui précèdent, en particulier en anaérobiose. Il est devenu évident depuis plusieurs années qu'elle est réalisée par des espèces dénitrifiantes **[40]**.

LinD et l'oxygénase LinE

Chez la cyanobactérie *Anabaena* PCC7120, la déchloration du Lindane dépend assez curieusement d'un opéron *nir* qui commande l'utilisation du nitrate et du nitrite **[41]**. Chez cet organisme comme dans d'autres cyanobactéries, l'utilisation du nitrate est aérobie et dépend de plusieurs gènes répartis en *nirA*, *ntrABCD* et *narB*. Ils codent pour la nitrite réductase, des protéines de transport du nitrate et la nitrate réductase. La déchloration ne fonctionne que lorsque l'opéron *nir* est fonctionnel, ce qui est le cas à la lumière et en absence d'ammonium. L'obscurité et l'ammonium inhibent les fonctions *nir*.

Transformation du Lindane par Anabaena

La déchloration du Lindane par des cyanobactéries comme les *Anabaena*, *Nostoc*, *Phormidium* et autres, est assez commune. Tout lien avec le métabolisme du nitrate reste sujet à caution et cette action résulte peut-être d'une propriété fortuite de la nitrate réductase. Les cyanobactéries ont des potentialités intéressantes, et l'introduction artificielle de gènes bactériens les rend capables d'attaquer d'autres polluants comme le 4-chlorobenzoate [**42**].

Parmi les insecticides organochlorés largement répandus jusqu'à une date récente, le **DDT** [6] a occupé une place emblématique. Il n'est que très lentement éliminé dans l'environnement, avec une demi-vie de l'ordre de plusieurs années, alors qu'il en a été fait massivement usage. La seule agriculture américaine en a utilisé plus

---

6 - *1,1,1-trichloro-2,2-bis(4'-chlorophényl)éthane.*

de mille millions de tonnes entre 1940 et 1972 ! L'inconvénient le plus grave est son accumulation dans l'organisme animal où il n'est éliminé que difficilement. Il s'accumule progressivement au niveau des lipides, et la contamination croît au fil des chaînes alimentaires pour culminer notamment dans les poissons consommés par l'homme. Son principal inconvénient est donc de polluer toute la chaîne alimentaire. Il a été fait un emploi très laxiste du DDT en agriculture. Avant l'embargo placé sur son usage dans de nombreux pays dès 1972, le DDT a été utilisé non seulement dans l'agriculture mais en vue d'éliminer les vecteurs de pathogènes dans les pays tropicaux. Au premier chef était la lutte contre la malaria. Le DDT a été utilisé aussi dès la dernière guerre mondiale pour lutter contre le typhus, la fièvre jaune, les maladies à trypanosomes. L'embargo s'est traduit par une terrible augmentation des cas de paludisme. La montée des cas mortels causés par la malaria dans le monde a été estimée à près de 2 millions par an, sur un total de plus de 200 millions de personnes paludéennes. De très vives polémiques ont été engagées quelque temps pour ou contre le DDT, qui est encore utilisé dans certains pays en voie de développement. La solution devrait être trouvée dans l'emploi de produits moins nocifs ou par d'autres méthodes. Les argumentations ne sont pas toujours d'ordre scientifique, mais reposent parfois sur des critères politiques ou des conflits d'intérêt. Ils dépassent le cadre biochimique fixé ici.

Une certaine minéralisation du DDT a été mise en évidence chez les champignons **[43]**. Des bactéries capables d'attaquer le DDT en cométabolisme ont été isolées à répétition, mais les transformations étaient souvent incomplètes. La diminution du DTT s'accompagne éventuellement de la montée d'un nouveau produit, le **DDE** [7], un composé plus toxique que le DDT et dont les effets se manifestent longtemps après arrêt de tout usage de l'insecticide. La transformation du DTT en DDE s'effectue par une **DTT déchlorase** (EC 4.5.1.1) :

On a cru pendant longtemps que le DDE était le stade ultime récalcitrant fait à partir du DDT. Dans les pays tropicaux, le DDE est partiellement éliminé par volatilisation dans l'atmosphère. Le DDE présente une certaine analogie avec un polychloro-biphényle (PCB). On peut donc s'attendre à ce que les espèces capables de dégrader les PCB puissent attaquer aussi le DDE. C'est effectivement ce qui a été constaté avec une souche de *Pseudomonas acidovorans*, et un *Terrabacter* **[44]**. Le DDE est doublement hydroxylé par une dioxygénase comme indiqué à droite sur le schéma, le procédé d'attaque habituel sur un cycle benzénique en présence d'O_2. Les auteurs HAY et FOCHT on étudié en détail les produits de transformation du DDE

7 - 1,1-dichloro-2,2-bis(4'-chlorophényl)éthylène.

lorsque les bactéries étaient cultivées sur biphényle **[45]**. En partant du métabolisme du biphényle déjà connu, et en identifiant par spectrométrie de masse les différents intermédiaires, il a été possible de construire un schéma probable des transformations conduisant à des composés aromatiques faciles à minéraliser. Le principe est donc très simple. Après double hydroxylation du DDE donnant le *cis*-dihydrodiol, une déshydrogénase aromatise à nouveau le cycle pour donner un catéchol. Une dioxygénase ouvre alors ce dernier en *méta :*

dH
dioxygénation méta
O_2
4-chlorobenzoate

Ce schéma conserve une part d'hypothèse. Il suggère une formation possible de 4-chlorobenzoate après un stade chloroacétophénone. Chez un *Ralstonia*, le DDT peut subir directement une double hydroxylation sans passer par le stade DDE, mais conduit aux mêmes produits finaux **[46]**. Des souches compétentes ont été isolées à partir de bactéries capables de croître en présence de biphényle. AISLABIE et coll. **[47]** ont recherché des bactéries capables de métaboliser le DDE en milieu solide recouvert d'une couche gélosée contenant ce produit. Comme le DDE est peu soluble, il formait un voile superficiel opaque. Le biphényle était utilisé comme substrat et inducteur. Il était placé dans le couvercle des boîtes de Petri et atteignait le milieu de croissance par diffusion dans l'air. Les colonies bactériennes capables d'attaquer le DDE étaient faciles à repérer car elles s'entouraient d'une zone claire dans le tapis opaque. *Terrabacter* DDE-1 a été isolé ainsi. Cette souche Gram-positive produit à partir du DDE une cascade d'intermédiaires, dont le 4-chlorobenzoate. On a ainsi l'impression que le DDT est biodégradable, mais les conditions de son élimination à une vitesse raisonnable sont rarement réalisées dans la nature. Aucune souche ne s'est montrée réellement capable de minéraliser entièrement le DDT comme seule source de carbone dans les conditions de laboratoire, et les transformations s'observent généralement par cométabolisme ou association de plusieurs espèces. On a envisagé des alternances d'aérobiose et d'anaérobiose. En effet des transformations du DDT à l'abri de l'air ont été observées à l'aide de *Proteus vulgaris* et *Klebsiella pneumoniae* placés en conditions dénitrifiantes. Il y a déchloration, réduction et décarboxylation sur pont carboné entre les deux cycles aromatiques. La figure suivante a pour but d'en donner une idée sommaire. Les réactions de ce schéma n'ont pas toutes été caractérisées et les renseignements restent fragmentaires. La saga du DDT n'est donc pas terminée.

HCl HCl [2 H]

H_2O HCl oxyd. CO_2

4-chlorophénylacétate

Le DDT en anaérobiose

D'autres insecticides organochlorés ont été responsables de pollutions considérées comme dangereuses, car ils se retrouvaient dans les animaux d'élevage et pouvaient se concentrer dans les lipides. Une déchloration réductrice est la première modification de ces produits dans l'environnement. Parmi ces insecticides sont les cyclodiènes comme l'**Aldrine,** utilisée autrefois en grande quantité pour la protection des cultures de maïs, du coton, ou dans la lutte contre les termites. Son époxydation au niveau du foie et par l'action des moisissures du sol la transforme en **Dieldrine**. Ces composés atteignent les plantes, contaminent les aliments et présentent des risques cancérigènes. D'autres insecticides de la même famille sont le **Chlordane** et l'**Heptachlor**.

Aldrine Dieldrine *après déchloration réductrice*

La première déchloration réductrice peut exercer une sélectivité illustrée par les énantiomères *syn* et *anti* après enlèvement de l'atome de chlore **[48]**. La dépollution efficace de ces divers pesticides, parfois répandus en abondance inconsidérée, reste le plus souvent problématique. Ils ont généralement en commun une grande rémanence et une forte toxicité qui rendent ces produits dangereux pour le bétail. Pourquoi a-t-on diversifié la fabrication de ces produits ? À l'origine il s'agissait de diversifier les moyens de lutte pour contourner l'apparition d'une résistance chez les insectes. Le Chlordane a été longtemps utilisé pour vaincre les termites. Mais ces armes efficaces se retournent contre nous. La tendance est donc de réserver l'emploi de ces pesticides aux professionnels avertis, ou de les interdire totalement. Mais dans les pays où ils sont interdits, on continue parfois à exporter les stocks dans les pays pauvres, ce qui procède tout de même d'un très regrettable cynisme.

La déchloration anaérobie des **poly-chlorobiphényles** (PCB) a fait l'objet de nombreuses recherches, parce que ces ingrédients sont généralement très récalcitrants en milieu aérobie dès que la molécule comporte plus de 2 ou 3 atomes de chlore, comme dans l'Aroclor 1242. L'Aroclor 1260 a plus de 4 atomes de chlore et sa biodégradation n'est connue qu'en anaérobiose. La déchloration réductrice enlève progressivement les atomes d'halogène par de l'hydrogène comme source d'électrons et conduit aux biphényles mono- et bichlorés.

$(Cl)_n$ — PCB — $(Cl)_{n'}$

La transformation de ces produits se poursuit en aérobiose. Les dégradations commencent dans les boues des rivières ou dans les sédiments à l'abri de l'air, avec des sélectivités en général compliquées, avant que des organismes aérobies prennent le relais et réussissent une minéralisation complète.

En résumé, les conditions anaérobies semblent les plus efficaces pour éliminer les molécules lourdement chlorées, et peuvent préparer le terrain à une dégradation plus complète. Nous retrouverons les déchlorations réductrices dans le cas d'un polluant célèbre, le pentachlorophénol.

13.7 - LE PENTACHLOROPHÉNOL

Le pentachlorophénol ou PCP est un biocide organochloré largement utilisé dans le passé pour la préservation du bois, essentiellement comme fongicide. On l'a employé aussi dans la fabrication du papier, dans la protection des tissus, et comme bactéricide. Par sa toxicité et sa rémanence dans le sol et les eaux, il est devenu un polluant majeur avant que son emploi soit maintenant restreint ou même interdit un peu partout. Les recherches ont montré que des souches bactériennes pouvaient se développer sur PCP comme seule source de carbone et d'énergie. Récapitulons les différentes solutions apportées à la déchloration du noyau aromatique :

- La déshalogénation réductrice remplace Cl par H. Elle correspond à une attaque électrophile du noyau, avec réduction du chlore à deux électrons et départ du chlorure.
- L'oxygénation remplace le chlore par un hydroxyle dont l'atome d'oxygène provient d'O_2.
- La déshalogénation par une halohydrolase remplace le chlore par un hydroxyle, mais l'atome d'oxygène vient de H_2O par une substitution nucléophile (arrivée de OH^-, départ de Cl^-). Moins "logique" qu'une attaque électrophile, elle suit un mécanisme plus compliqué faisant intervenir le glutathion.
- Le chlore est enlevé par désaturation (forme une double liaison) comme dans le cas du Lindane.

- La coupure du cycle aromatique intervient avant que l'halogène soit soustrait en totalité.

La biodégradation du PCP est possible avec ou sans oxygène. Le chemin métabolique a été analysé en détail chez *Flavobacterium* ATCC 39723, dans un *Burkholderia cepacia* (ancien *Pseudomonas cepacia*) et chez des actinomycètes (*Rhodococcus chlorophenolicus* et *Mycobacterium fortuitum*) **[49]**. Le schéma indique les trois premières déchlorations aérobies du PCP par *Flavobacterium* et *Burkholderia*. La **PCP-4-mono-oxygénase** catalyse la première réaction (**1**), et conduit à la 2,3,5,6-tétra hydroquinone (TeCH). Les deux autres réactions (**2** et **3**) sont réductrices et engendrent la 2,6-dichlorohydroquinone (DiCH).

Premières déchlorations sur le PCP

La mono-oxygénase initiale de *Flavobacterium* a été étudiée en détail, son gène *pcpB* a été cloné dans *E. coli* et séquencé **[50]**. L'enzyme a un double intérêt, d'abord d'appartenir à la famille des mono-oxygénases du noyau aromatique utilisant le NADPH comme donneur d'électrons, ensuite d'être peu spécifique et d'attaquer divers phénols halogénés. On observera que la réaction consomme 2 NADPH par mole de substrat, la deuxième molécule de réducteur étant nécessaire pour la réduction du chlore en chlorure. Voici quelques phénols attaqués par cette mono-oxygénase **[51]**. La substitution par un hydroxyle a lieu en *para* par rapport à la fonction phénol, avec départ des entités indiquées. Le chiffre en gras indique le nombre de moles de NADPH consommé par mole de substrat.

Quelques substrats de la PCP-4-mono-oxygénase

L'enzyme attaque également le Bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile), un herbicide que *Flavobacterium* est capable de minéraliser entièrement **[52]**.

Là encore, l'oxygénase attaque la position *para* par rapport à l'hydroxyle. Il n'y a donc pas débromation au cours de cette première réaction, mais libération de cyanure. Le Bromoxynil est dégradé par d'autres espèces selon un protocole distinct. *Pseudomonas putida* et *Rhodococcus rhodocrous* font du 3,5-dibromo-4-hydroxybenzamide par hydratation de la fonction nitrile en amide.

Attaque du Bromoxynil

Revenons à *Flavobacterium* sur PCP. Les trois premières réactions ont éliminé chacune un ion chlorure, produisant la 2,6-dichlorohydroquinone (DCHQ). Il n'y a plus que 2 Cl à enlever. L'ouverture du cycle par une dioxygénase a lieu à ce niveau **[53]**. Le produit formé s'hydrate spontanément en éjectant un quatrième ion chlorure. Le dernier atome de chlore en lice saute à son tour par une réduction. Une ultime réduction conduit au **3-oxoadipate** (3-OA), que nous connaissons bien pour l'avoir rencontré dans la voie *ortho* du catéchol.

Vers le 3-oxoadipate

Ceci montre comment un substrat lourdement halogéné comme le PCP peut perdre successivement ses 5 atomes de chlore et se voir transformer en un produit aisément métabolisable comme le 3-OA, source d'acétyl-CoA et de succinyl-CoA. L'acquisition d'une voie métabolique capable de détruire un xénobiotique comme le PCP a quelque chose de miraculeux. Elle aurait pu avoir plusieurs origines par le jeu de transferts génétiques horizontaux successifs et de recombinaisons (*patchwork hypothesis*). Des oxygénases prenant pour cible des phénols chlorés naturels auraient été recrutées. La deuxième enzyme de la voie du PCP réduisant le TeCH pourrait provenir d'une isomérase appartenant à la dégradation de la tyrosine, une filiation vérifiable par les comparaisons de séquences **[54]**. Le Bromoxynil, l'herbicide évoqué antérieurement, donne lieu à un métabolisme similaire où le brome remplace le chlore. La biodégradation **anaérobie** du PCP conduit à sa minéralisation complète dans des cultures bactériennes mixtes non définies, où il n'est pas facile d'analyser le rôle des différents organismes responsables. Le chlore est éliminé du

noyau par déshalogénations réductrices successives. Dans les boues non exposées préalablement à un chlorophénol, la déshalogénation du PCP commence généralement en *ortho*. Les boues acclimatées à différents chlorophénols exercent une certaine régiosélectivité, c'est-à-dire à un enlèvement du chlore à des positions préférentielles du cycle. À titre d'exemple, l'attaque du PCP par des boues acclimatées à l'un des trois phénols monochlorés (désignés par 2-CP, 3-CP,4-CP) démarre de la façon suivante **[55]** :

sur 3-CP — PCP — sur 2-CP — sur 4-CP

Déchloration du PCP après acclimatation sur différents chlorophénols (CP)

L'acclimatation des boues sur plusieurs chlorophénols fait apparaître un mélange de produits ayant perdu de un à quatre atomes de chlore à différentes positions, mais conduit à des phénols récalcitrants, les 3,5-, 3,4- 2,4-dichlorophénols, et le 4-chlorophénol. Cependant la minéralisation complète du PCP marqué au carbone-14 en méthane et dioxyde de carbone marqués a été observée dans des granules méthanogènes **[56]**. L'opération est lente, nécessite l'apport de sources carbonées supplémentaires comme le glucose. Aussi le nettoyage de zones fortement contaminées par le PCP, notamment aux Etats-Unis, a-t-il donné lieu à des opérations longues et coûteuses. Par la suite on s'est aperçu que d'excellents résultats s'obtenaient tout simplement par le compostage (qui implique une certaine aération) et par l'épandage de fumier animal **[57]** ! De façon générale, la déshalogénation réductrice s'exerce sur des composés lourdement chlorés, ce que nous avions eu l'occasion de remarquer dans le cas de l'hexachlorobenzène et des poly-chlorobiphényles.

Cette question a été le point de départ d'avancées intéressantes sur le plan fondamental. Tout d'abord, elle nous a permis d'appréhender la variété des voies et la complexité des adaptations dans les populations microbiennes mixtes. Elle a permis ensuite d'identifier les germes concernés et d'isoler les enzymes responsables. Il est alors devenu évident que diverses espèces bactériennes tiraient de l'énergie pour leur croissance en anaérobiose à partir de la déshalogénation des composés polychlorés. Nous retrouvons ici le processus appelé **déshalorespiration**. Le PCP et substrats similaires servent donc d'accepteurs d'électrons dans un mécanisme respiratoire utilisant comme donneurs l'hydrogène, le formiate ou différents substrats organiques. Il en résulte un stockage d'énergie sous forme d'un potentiel de membrane, source potentielle d'ATP **[58]**. Le cas le plus étudié est celui

de *Desulfomonile tiedjei* DCB-1, une souche déjà citée parce qu'elle est capable d'utiliser le 3-chlorobenzoate comme accepteur d'électrons. Ce sulfato-réducteur peut déshalogéner une gamme assez étendue de substrats chlorés, parmi lesquels divers polychlorophénols, les benzoates et benzamides monohalogénés ! La déshalogénation du PCP effectuée par *D. tiedjei* s'exerce surtout sur les deux positions *méta*, cette propriété étant inductible par le 3-chlorobenzoate. Des analogues de celui-ci sont également inducteurs, tous substitués en *méta*. Beaucoup d'inducteurs ne sont pas substrats et réciproquement. La déshalogénation peut aussi survenir en *ortho* et en *para*.

COOH, CH_2OH, $CONH_2$
(OH, NH_2 exclus)
Cl, Br, I, F, CH_3, CF_3
(CHO, NH_2, CN, OH exclus)

Inducteurs de déshalogénaion (*D. tiedjei*)

La recherche systématique de souches compétentes dans les boues d'épuration a révélé que diverses espèces bactériennes pouvaient fonctionner sur un principe analogue. Ces espèces ne sont pas toutes sulfato-réductrices, mais comptent des bactéries dénitrifiantes. Certaines sont Gram-positives, dont un *Clostridium* DCB **[59]** capable de dégrader une large gamme de chlorophénols. Cette souche pourrait combiner à la fois une fermentation et une respiration, la première fournissant l'hydrogène dont la seconde a besoin comme donneur d'électrons. Contrairement à *D. tiedjei*, DCB est peu active à la position *méta*, enlève au mieux 29 µmol de chlorure par heure et par g de protéine, contre 54 µmol pour la première. Inversement elle attaque 30 fois plus vite le 2,4,6-trichlorophénol. La souche DCB aurait aussi plusieurs déshalogénases induites par des produits différents ! Ces quelques éléments nous aident à comprendre l'étendue du problème, la diversité des solutions rencontrées et la richesse des renseignements acquis. L'étude d'un problème pratique posé par l'épuration de produits polluants peut conduire comme ici à une percée des connaissances fondamentales en bioénergétique.

13.8 - CARBAMATES ET PYRÉTHROÏDES

Cette section concerne des produits communs. Le terme de carbamate englobe dans la pratique une famille d'insecticides et de fongicides très utilisés comme les N-méthylcarbamates porteurs d'une fonction hydrolysable carbamique ou ester. Ces composés sont biodégradables et inactivés par hydrolyse, mais présentent des risques pour l'environnement et la santé par suite de leur emploi intensif et répété. Ils sont employés comme insecticides systémiques à large spectre, les plus connus étant le **Carbaryl** ou Sevin, et l'**Aldicarbe**. La fabrication du Carbaryl est à l'origine de la terrible catastrophe de Bhopal en Inde, en décembre 1984, faisant un nombre énorme de victimes. L'usine de l'Union Carbide effectuait la synthèse de l'isocyanate de méthyle à partir du phosgène, et le condensait à l'α-naphtol. Une négligence fut à l'origine d'une entrée d'eau dans une cuve contenant plusieurs dizaines de tonnes d'isocyanate de méthyle, provoquant une explosion libérant

plusieurs gaz, dont l'acide cyanhydrique, lequel fit le plus grand nombre de victimes [8]. Ce fut probablement la plus terrible catastrophe industrielle des temps modernes. Assez curieusement, on continue à désigner les installations à risque en milieu urbain comme usines "*Seveso*", faisant référence à un accident qui n'a fait que très peu de victimes mais qui a été à l'origine d'une prise de conscience.

En raison de sa solubilité dans l'eau, le Carbaryl est vraisemblablement très mobile dans les sols. De manière générale, la persistance des insecticides du type carbamate est assez faible (moins de 4 mois) du fait de leur mobilité et de leur fragilité aux agents biologiques. Néanmoins le Carbaryl a l'inconvénient d'être dangereux pour les abeilles. Oxygénations et hydrolyse sont les étapes initiales de l'attaque du Carbaryl par les *Aspergillus* (**1**). L'attaque hydrolytique du Carbaryl par les bactéries du sol (**2**) a été décrite à plusieurs reprises depuis 1972, les bactéries étudiées étant des *Arthrobacter*, *Pseudomonas* et *Blastobacter* **[60]**. Les champignons *Glicladium* sont des ectomycorhizes et attaquent le Carbaryl par hydroxylation (**3**).

Dégradation du Carbaryl

L'estérase d'un *Rhizobium* hydrolyse le Carbaryl en α-naphtol et méthylamine. L'enzyme a été isolée et séquencée. Son gène *cehA*, fait partie d'une structure chromosomique qui serait un transposon. Une souche d'*Arthrobacter* (RC100) peut se développer sur Carbaryl comme seule source de carbone et d'énergie, et minéraliser entièrement le produit de départ **[61]**. Elle contient trois plasmides. L'un d'eux (pRC1) héberge le gène d'une hydrolase qui transforme le Carbaryl en α-naphtol. Un second (pRC2) code pour la voie qui conduit au gentisate en passant par le salicylate. La dernière phase est codée par des gènes du chromosome. Les bactéries débarrassées des plasmides sous l'action de la mitomycine continuent à se développer sur gentisate mais cessent de dégrader le Carbaryl. Leur retour de pRC1 et pRC2 par conjugaison restaure entièrement cette propriété.

---

8 - La fabrication du Sevin en Inde était censée venir en aide contre les ravageurs responsables de la famine. Lire le livre de Dominique LAPIERRE et Javier MORO : Il était minuit cinq à Bhopal (éditions ROBERT LAFFONT).

Ces exemples montrent que le pouvoir de dégrader le pesticide a été acquis au cours de la phase d'acclimatation par introduction d'un transposon et de plasmides.

Un autre insecticide systémique de la famille des carbamates est le **Carbofuran**. Il a été très utilisé comme nématicide, mais on a commencé à s'inquiéter au cours des dernières années sur la contamination des eaux par un usage excessif et sa toxicité sur le personnel. Largement utilisé dans les rizières, il a l'inconvénient d'être toxique pour la microflore utile **[62]** dont les cyanobactéries assimilatrices d'azote. Il est modérément soluble dans l'eau (0,7 $g.L^{-1}$) et sa minéralisation complète par *Pseudomonas* ou *Micrococcus* a été observée après un temps assez long **[63]**. Les agents actifs sont éventuellement les mêmes que ceux qui attaquent le Carbaryl. L'étape la plus facile est comme on pouvait le prévoir l'hydrolyse, le chaînon latéral étant très rapidement métabolisé alors que le phénol formé et le dérivé hydroxylé du Carbofuran sont relativement persistants et adhèrent aux particules du sol.

HO–C(=O)–NH–CH$_3$ ···› CO_2 (*rapide*)

carbofuran → phénol + 3-hydroxycarbofuran

Attaque du Carbofuran

Un cas intéressant est celui d'un méthylotrophe capable de se développer très rapidement sur Carbofuran et d'autres carbamates (Bendiocarb, Propoxur) comme seule source de carbone et d'azote **[64]**. La partie métabolisée après hydrolyse est la chaîne latérale, avec persistance de la partie aromatique. Là encore, l'acquisition de cette propriété semble due à la dissémination d'un plasmide apportant les gènes essentiels. D'autres insecticides sont aussi éliminés par hydrolyse. Le pyrèthre est un insecticide naturel tiré de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, peu toxique mais relativement fragile à la lumière et d'action assez brève. Il a été amélioré par inclusion dans des *cyclodextrines**. Divers pyréthroïdes de synthèse sont répandus sur le marché, notamment la **Cyperméthrine** et la **Perméthrine**. Ils sont plus stables et d'action plus durable. Leur biodégradation complète est réalisée par des *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Achromobacter*.

La figure suivante montre que l'hydrolyse libère deux parties qui sont entièrement minéralisées. D'autres voies mineures n'ont pas été indiquées. Ces produits entièrement synthétiques sont auréolés de leur parenté avec des composés naturels et facilement biodégradables. Leur mode d'action est de bloquer le transport des ions sodium dans les cellules nerveuses des insectes et des acariens.

Attaque de la Perméthrine

13.9 - HERBICIDES DU GROUPE DES TRIAZINES

Les triazines sont des cycles insaturés à caractère aromatique comprenant 3 atomes de carbone et 3 atomes d'azote. Dans les triazines symétriques ou *s*-triazines, carbone et azote alternent autour du cycle qui est assemblé par trimérisation de nitriles en milieu acide.

s-Triazines

Cette famille de produits contient la **Simazine** et l'herbicide le plus utilisé d'entre eux, l'**Atrazine**. Leur action à large spectre est d'inhiber la chaîne d'oxydoréductions de la photosynthèse au niveau du PS II en s'installant au site Q_B **[65]**. L'Atrazine entrerait surtout par voie racinaire avant de remonter dans la plante en gagnant les feuilles. Cependant ces produits présentent de forts effets différentiels. Certaines espèces végétales sont intrinsèquement plus résistantes que d'autres et on associe généralement plusieurs herbicides pour un même traitement, par exemple la terbuthylazine, efficace sur liseron, chiendent et rumex, associée à la Simazine pour désherber les vignes. L'Atrazine était indiquée pour la culture du maïs. La raison en est que le maïs contient un glucoside spécial capable de neutraliser l'Atrazine en replaçant l'atome de chlore par un hydroxyle. Ce glucoside est présent dans les axes du maïs et permet une détoxification spontanée. Une fois dans les feuilles, l'Atrazine est hydroxylée en 2, avec départ de chlorure, à l'aide d'une

enzyme fonctionnant avec du glutathion. Ces actions s'avèrent efficaces puisque les neuf dixièmes de l'Atrazine présente dans la plante sont neutralisés au bout de quelques heures. Par contre ces défenses n'existent pas chez d'autres plantes comme l'avoine. On voit donc pourquoi l'Atrazine a été utilisée massivement dans les régions productrices de maïs, notamment aux Etats-Unis. En France, au moins 90% des surfaces cultivées en maïs au cours de l'année 2000, soit plus de 2 millions d'hectares, avaient reçu de l'Atrazine. La consommation annuelle, en baisse, était de 750 g d'herbicide par hectare. Son usage avait été interdit en 1997 pour des usages autres qu'agricoles. Malheureusement l'Atrazine n'est pas un produit dénué de risque. Souvent répandue un peu trop généreusement par les cultivateurs, elle est facilement entraînée dans le sol malgré sa faible solubilité (33 $mg.L^{-1}$), et vient souvent contaminer les nappes phréatiques. On lui préfère parfois la simazine, moins soluble (6 $mg.L^{-1}$) et plus facilement retenue dans les couches superficielles du sol. Ces herbicides ne sont éliminés qu'assez lentement. La toxicité de l'Atrazine reste modérée (LD50 de 670 $mg.kg^{-1}$ chez le rat), mais suffisamment préoccupante pour la santé en cas de contamination de l'eau et des animaux, bien qu'elle soit déclarée non cancérigène. L'interdiction d'emploi de l'Atrazine et de la Simazine a été décidée en France en Septembre 2002.

L'Atrazine et les composés homologues utilisés comme herbicides sont lentement biodégradables. La plupart des études ont porté sur l'Atrazine et ont mis en évidence l'intervention des bactéries et de certains champignons (*Penicillium*, *Fusarium roseum*, *Aspergillus niger*). Il y a deux stratégies principales. La première débute par l'action d'une chlorohydrolase, qui remplace le chlore par un hydroxyle (*Pseudomonas souche ADP*, *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Agrobacterium*). La seconde part d'une mono-oxygénation (*Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*). La première voie est lancée par une chlorohydrolase. Le métabolisme se poursuit par l'enlèvement successif des deux chaînes latérales. La deuxième voie inverse les étapes : l'attaque commence par une mono-oxygénation sur chaîne latérale avant remplacement du chlore. La figure montre la première voie :

A - Atrazine chlorohydrolase
B - Hydroxy-Atrazine éthylaminohydrolase
C - N-isopropylammelide isopropylaminohydrolase
D - Acide cyanurique amidohydrolase
E - Biuret amidohydrolase
F - Uréase

Dégradation de l'atrazine par Pseudomonas sp.

La première réaction de cette succession connue depuis 1993 est catalysée par l'**Atrazine chlorohydrolase** (AtzA), qui enlève l'halogène et suffit à inactiver le pouvoir herbicide. Son rôle est donc essentiel. La protéine a été purifiée et montre une spécificité qui s'étend à plusieurs substrats voisins de l'Atrazine dont un analogue fluoré **[66]**. Il a été démontré que la réaction était purement hydrolytique **[67]**. Les deux réactions suivantes, catalysées par AtzB et AtzC, conduisent à l'**acide cyanurique**, que maintes bactéries du sol savent dégrader par les réactions D, E et F. La dernière réaction est celle de l'uréase, une enzyme très anciennement connue dont une particularité est de contenir du nickel. Les trois protéines AtzA, AtzB et AtzC sont codées par un plasmide. On a eu la surprise de constater qu'elles présentent des ressemblances de séquences entre elles, et avec d'autres hydrolases porteuses d'ions métalliques : dihydro-orotase, adénine désaminase, cytosine désaminase. Une séquence ancestrale commune serait à l'origine d'une vaste famille de protéines où figurent des enzymes du métabolisme des bases nucléiques. L'alignement des séquences de AtzC (l'aminohydrolase catalysant l'étape C sur notre tableau) et CodA, la cytosine désaminase du colibacille, montre dans certaines zones une correspondance troublante. Les motifs histidine (H) et la paire HxH (petites flèches sur la figure) sont considérés comme site d'attachement d'un métal.

```
AtzC
56             64  206          217    244       303
FV DA H T H M D–––LA KE YD VD ID Y H–––RVT T SH–––D NIR D F W V P F G––
FV RP H I H L D–––LA QK YD RL ID V H–––RVT A SH–––D DVF D P W V P L G––
57             65  203          214    241       313
CodA ↑  ↑                         ↑           ↑   ↑
```

Toutes les protéines de cette famille fixent facilement un métal, et plusieurs d'entre elles ont un noyau bi-métallique. La cytosine désaminase, par exemple, peut lier du zinc, du cobalt, du manganèse, et son maximum d'activation s'obtient avec du fer. Dans le cas de AtzC, le fer ou le cobalt sont des activateurs, mais le véritable métal présent dans le site actif serait le zinc **[68]**. Cet exemple montre pourquoi les comparaisons de séquences suggèrent que AtzA, AtzB et AtzC sont des métallo-enzymes, avant même que les métaux aient été caractérisés dans les protéines purifiées. Le plus curieux est l'apparente banalité des gènes homologues de *atzA*, *atzB* et *atzC* dans la nature, si on en croît une recherche systématique faite par sondes nucléiques et amplification PCR. En fait les protéines Atz font partie de la superfamille des amidohydrolases représentée chez tous les êtres vivants, catalysant l'hydrolyse des amides et de la liaison C–N des amines. Ces enzymes se rencontrent dans le métabolisme de l'histidine, des bases des acides nucléiques et de l'urée. On constate une fois de plus que la nature paraît avoir adapté et diversifié des formulations de base permettant la digestion de nouvelles substances, et c'est finalement heureux pour nous. Cette possibilité est confirmée par la facilité avec laquelle on peut sélectionner des mutants munis d'une chlorohydrolase améliorée, susceptibles d'applications intéressantes en station d'épuration **[69]**. L'Atrazine n'est certainement pas la seule cible de AtzA. Ainsi *Clavibacter michiganese* possède une AtzA travaillant comme chlorohydrolase sur plusieurs analogues de l'Atrazine, le chlore étant remplacé par un groupe cyano (cyano-Atrazine),

azido (azido-Atrazine), OCH_3 (Atratone), SCH_3 (Ametryne), ou encore par des chaînes latérales différentes (propazine, terbutylazine). Toutes les bactéries ne sont pas armées pour métaboliser entièrement l'Atrazine. Cet objectif est atteint éventuellement par des associations d'espèces amenant chacune un ou deux gènes participant aux transformations. Les associations microbiennes ont comme d'habitude un rôle essentiel dans la nature pour détruire des substrats hors norme, et chaque espèce participante apporte son savoir faire chimique.

La deuxième voie de dégradation de l'Atrazine, qui commence par l'action d'une mono-oxygénase, diffère de la précédente dans son principe. L'attaque commence par l'ablation des chaînes carbonées latérales, suivie de la désamination du noyau et de l'élimination ultérieure du chlore. Le résultat est encore l'acide cyanurique qui est facilement éliminé par les bactéries du sol. Les chaînes latérales sont-elles alors attaquées par une hydrolase ? Pas exactement puisque leur enlèvement se fait par mono-oxygénase. Une hydrolase couperait la chaîne latérale au ras du cycle triazine, laissant un hydroxyle et faisant partir l'azote sous forme d'amine. Ici l'azote reste en place, la partie qui s'élimine est un aldéhyde ou une cétone, comme l'indique le schéma :

Atrazine mono-oxygénase

Ces oxygénations se rencontrent chez des *Pseudomonas*, *Streptomyces* et divers actinomycètes **[70]**. Une mono-oxygénase active sur Atrazine a été identifiée chez un *Rhodococcus* comme un **cytochrome P450** peu spécifique codé par un plasmide, qui détermine aussi la dégradation des thiocarbamates [**71**]. Cette enzyme fonctionne avec la participation d'une réductase et d'une ferrédoxine [2Fe-2S]. Les *Rhodococcus* sont des germes intéressants par la diversité de leurs actions dépolluantes sur les hydrocarbures, les haloaromatiques, les pesticides et les herbicides... En outre ces bactéries sont relativement peu sensibles à la *répression catabolique**, ce qui leur permet de continuer à fabriquer des enzymes de dégradation tout en se développant sur une source carbonée du type glucose. Une facilité très importante sur le plan pratique comme on le sait. La dégradation de l'Atrazine par mono-oxygénation peut se poursuivre par déchloration et désamination. La figure montre l'intermédiaire désalkylé ou déisopropyl-déséthyl-Atrazine (DIEA) :

DIEA

acide cyanurique

L'Atrazine est-elle éliminée en anaérobiose ? Une observation récente permet de répondre par l'affirmative, à l'aide d'un organisme non identifié fixé sur colonne **[72]**. Les conditions étaient celles de la dénitrification, démontrée par la production de N_2 marqué à l'azote-15 à partir de $^{15}NO_3^-$. L'Atrazine marquée au carbone-14 était à l'origine de CO_2 radioactif. La décontamination simultanée du nitrate et de l'herbicide dans une eau d'origine agricole est donc possible.

13.10 - ANILIDES ET ANALOGUES

Les anilides sont des dérivés N-acylés de l'aniline (aminobenzène), sans autre substituant sur le noyau aromatique. D'autres produits leur sont apparentés et ont un noyau porteur d'atomes de chlore ou d'autres éléments. Ces herbicides agissent sur la photosynthèse ou remplacent des auxines, avec divers effets sélectifs. Leurs cibles les plus nombreuses sont des plantes à larges feuilles ainsi que les graminées. Les problèmes environnementaux viennent de leur rémanence dans le sol et des transformations en composés toxiques qui rappellent les dioxines. Voici des exemples, dont le Propanil et le Propanochlor. Les noms chimiques exacts sont en note [9] :

Propanil Pentanochlor Chlorotoluron Naproanilide

Herbicides dérivés d'anilides

9 - *De g. à dr. : 3'4'-dichloropropananilide, 3'-chloro-2,4'-diméthylpentananilide, 3-(3-chloro-4-méthylphényl)-1,1-diméthylurée, 2-(2-naphtyloxy)-N-phénylpropanamide.*

Tous sauf le Chlorotoluron sont photosensibles et transformés en composés inactifs. Nous n'évoquerons que leurs transformations biologiques. Ces produits sont utilisés pour le désherbage dans les cultures de riz (Propanil, Naproanilide), des cultures maraîchères (Pentanochlor), et du blé d'hiver (Chlorotoluron), en particulier contre la graminée *Alopecurus myosuroides* ou encore la folle-avoine (*Avena fatua*). Chose intéressante, ces herbicides sont métabolisés par les plantes après avoir été absorbés par les feuilles ou les racines, et l'intensité des modifications serait en grande partie responsable de la sélectivité de ces produits. La multiplicité de ces préparations chimiques s'explique par les tentatives de contrer les mauvaises herbes sans nuire aux cultures. Que le métabolisme de ces herbicides soit pratiqué par des plantes ou des bactéries du sol, il commence par une hydrolyse de la liaison amidique à l'aide d'une amidase.

CH_3
O–CH–COO^-
NPA

Le Naproanilide est un cas particulier : ce composé est inactif par lui-même comme herbicide, mais son hydrolyse libère l'acide 2-(2-naphtoxy)propionique (NPA) qui est le véritable herbicide. Son action est celle d'une auxine et ne porte pas sur la photosynthèse.

La détection des produits intermédiaires se fait généralement à l'aide de substrat marqué. On a peu de renseignements sur les réactions individuelles. Voici par exemple quelques transformations observées dans les plantules de riz. Une partie de la radioactivité se retrouve dans un glucoside et dans la lignine, par liaison avec la 3,4-dichloroaniline.

O
NH–C–C_2H_5
Cl
Cl
propanil
O OH
NH–C–CCH_3
H
Cl
Cl
acide lactique
acide propionique
NH_2
Cl
Cl
conjugaison au glucose
liaison avec la lignine

Attaque du Propanil chez le riz

La transformation de l'herbicide par les végétaux offre un cadre assez favorable à son emploi, ce qui explique son usage très répandu pour la culture du riz. En outre, le produit s'hydrolyse assez vite en milieu aqueux pour libérer la 3,4-dichoroaniline. Celle-ci est assez mobile, facilement entraînée par l'eau, mais elle a la propriété de se fixer sur les particules d'humus du sol, où elle peut persister assez longtemps.

NH_2
entraînement
Cl Cl H N humus
Cl Cl
oxydation
Cl N N Cl Cl
Cl
Cl^-
biodégradation CO_2
H_2O
3,4-dichloroaniline

Le produit d'hydrolyse du Propanil a le grave inconvénient de s'oxyder en tétrachloro-azobenzène, un composé très toxique rappelant les dioxines, avec un pouvoir cancérigène et un risque de troubles anémiques chez les personnes exposées. Sa biodégradation complète a été observée à l'aide des micro-organismes du sol, bactéries (*Pseudomonas*) ou champignons (*Fusarium*). L'aniline et les chloroanilines [10] sont des polluants industriels qui ont la propriété de se lier aux groupes quinoniques de l'humus. Une dioxygénation de l'aniline la transforme en catéchol après désamination et départ d'ammoniac. L'élimination des chloroanilines est plus lente mais possible. Il y a deux mécanismes de base. Le premier est une réduction anaérobie en conditions dénitrifiantes qui remplacent la fonction amine par un atome d'hydrogène. Ainsi un *Rhodococcus* a été vu transformer la **3,4-dichloroaniline** en 1,2-dichlorobenzène [**73**]. La seconde se fait en présence d'oxygène par une dioxygénation. Un certain nombre de dérivés halogénés et méthylés de l'aniline sont convertis en un catéchol qu'un *Moraxella* métabolise par la voie *ortho* [**74**]. La **2-chloroaniline** est ainsi minéralisée par *Pseudomonas acidovorans* [**75**]. L'intervention d'une dégradation de l'aniline et de ses divers dérivés par la voie *méta* est également possible chez un *Pseudomonas*. Elle se traduit par l'induction d'une catéchol 2,3-dioxygénase [**76**]. Les nombreuses études réalisées suggèrent que la majorité de ces produits sont exposés à l'action microbienne.

13.11 - SULFATES - SULFONATES

Les sulfates sont des esters de l'acide sulfurique, caractérisés par l'enchaînement C–O–S et la structure $R{-}O{-}SO_3H$. Dans les sulfones, le soufre est directement lié au carbone comme dans $R{-}SO_3H$. Ces deux catégories renferment de nombreux produits naturels qui représentent la part prédominante du soufre dans les sols. Dans le règne animal existent des ester-sulfates variés parmi les glycosaminoglycanes et d'importants constituants des tissus conjonctifs. Des sulfones remarquables sont le coenzyme M ($HS{-}CH_2{-}CH_2{-}SO_3H$) de la méthanogénèse, et chez les mammifères la taurine ($H_2N{-}CH_2{-}CH_2{-}SO_3H$) née de la *L*-cystéine par oxydation et décarboxylation. Le méthane-sulfonate est engendré à partir du diméthyl-sulfure des algues marines. Les plantes ne sont pas en reste, car les sulfonolipides sont des constituants importants des membranes où s'effectue la photosynthèse : ils sont

10 - *Parmi les principaux usages de l'aniline et de ses dérivés chlorés est la production des isocyanates et des uréthanes. On les utilise aussi dans l'industrie du caoutchouc, dans la fabrication des colorants.*

probablement les sulfonates les plus importants de la biosphère. On pense que beaucoup de sulfonates du sol sont engendrés par addition de sulfure sur des liaisons carbone-carbone insaturées. L'humus, d'une grande diversité de structure et de composition, est le siège d'une chimie complexe où les sulfonations et désulfonations alternent sous l'empire des micro-organismes. L'industrie ajoute à l'environnement des sulfates et sulfones sous la forme de détergents, colorants, additifs et intermédiaires variés. Exemples de détergent : le sodium dodécylsulfate (**SDS**) et les alkylbenzène sulfonates linéaires (**LAS**). Le toluène-sulfonate est très répandu comme agent solubilisant.

$C_{12}H_{55}–SO_3^-$, Na^+ — SDS

HSO_3–(benzène)–CH[$(CH_2)_k$–H_3C][$(CH_2)_J$–H_3C] — LAS

HSO_3–(benzène)–CH_3 — Toluène-sulfonate

Les populations microbiennes sont généralement bien armées pour hydrolyser ces composés, considérés le plus souvent comme n'offrant pas de risque majeur à condition que le reste de la molécule soit lui-même facilement dégradable. C'est pourquoi les LAS, largement utilisés dans les produits ménagers depuis une quarantaine d'années, ont remplacé des produits contenant une chaîne aliphatique ramifiée, plus récalcitrante. La détection des LAS dans les cours d'eau, lorsque la chaîne droite possède 10 à 12 atomes de carbone, est un indicateur commode des épandages domestiques.

L'assimilation du sulfate par les bactéries est soumise à une régulation qui a pour effet d'induire diverses protéines appelées SSI (*sulfate starvation-induced*) destinées à faire face à une carence en soufre. Chez le colibacille et *Pseudomonas aeruginosa*, les gènes concernés font partie d'un régulon placé sous la dépendance de CysB, et réglant la synthèse de la *L*-cystéine **[77]**. On relève parmi ces protéines divers composants de transport, des sulfatases et des sulfonatases. Les sulfatases (EC 3.1.6.x) sont très répandues dans la nature. Les mieux connues sont les **arylsulfatases** actives par exemple sur les LAS et isolées à partir du colibacille, de *Pseudomonas*, de *Klebsiella*, des mycobactéries [11], de cyanobactéries et autres germes **[78]**. Voici les particularités les plus intéressantes. Ces enzymes sont souvent présentes sous des formes multiples (isoenzymes), tantôt périplasmiques (*Klebsiella*), tantôt intracellulaires. Elles ont toutes une séquence consensus (C ou S)xPxRx$_4$TG. Une modification secondaire nécessaire à l'activité oxyde la cystéine ou la sérine dans ce consensus et fait apparaître la **formylglycine** (Fgly) comme l'explique la figure suivante.

11 - *Base d'un test d'identification pour le genre Mycobacterium.*

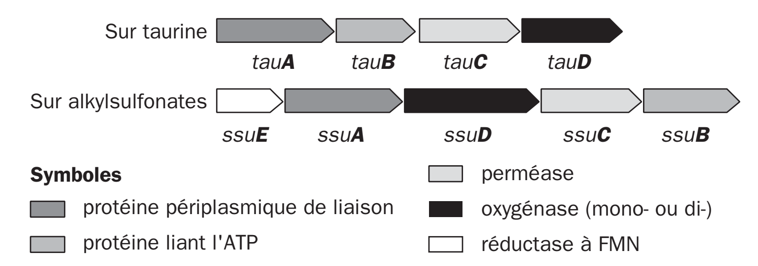
Modification secondaire de Cys ou Ser

Les cellules humaines contiennent des sulfatases au niveau de leurs lysosomes. Une maladie héréditaire rare, ou MSD (*multiple sulfatase deficiency*), s'accompagne de la disparition de ces sulfatases et de troubles variés (surdité, malformations osseuses, hypertrophie de la rate et du foie, et anomalies de la peau). On a pour cela une explication : le défaut ne réside pas au niveau des gènes de sulfatase, mais au niveau du mécanisme qui effectue la modification secondaire en Fgly. Le mécanisme des arylsulfatases implique la formation d'un intermédiaire covalent, expliqué par le schéma **[79]** :

Mécanisme d'une sulfatase

Les gènes contrôlant la synthèse des sulfatases et enzymes d'activation sont réprimés par le sulfate et induits par la présence de méthionine ou de sulfates organiques. Ils font figure de mécanisme de secours en cas de carence de sulfate assimilable.

Les **alkylsulfatases**, comme celle qui hydrolyse le SDS chez *Bacillus cereus* **[80]**, opèrent de façon différente. La liaison rompue n'est pas O–S, mais la liaison carbone-oxygène sans passage par un stade covalent. La modification génératrice de Fgly est absente. La dégradation des alkylsulfonates diffère de celle des arylsulfonates par le mécanisme. Vu l'abondance dans l'environnement de sulfonates naturels ou artificiels, il n'est pas étonnant que les souches bactériennes capables de les dégrader soient banales. Les premières études se sont consacrées à la désulfonation de la taurine, pratiquée par *E. coli* et diverses entérobactéries, mais ce cas de figure n'est pas entièrement représentatif. L'examen génétique montre que le colibacille a deux opérons distincts impliqués dans les désulfonations. Le premier, *tauABCD*, concerne la taurine. Le second, *ssuEADCB*, dirige la désulfonation des substrats aliphatiques. Ces deux systèmes diffèrent par leurs composants et les modes opératoires.



Opérons de désulfonation chez Escherichia coli

Le premier mode est catalysé par **TauD**, une dioxygénase activée par Fe^{2+}, dont la particularité est d'oxyder le **2-oxoglutarate** (2-OG) en même temps que la taurine **[81]**. Celle-ci est transformée en intermédiaire instable qui se décompose en amino-acétaldéhyde et sulfite. La taurine peut aussi servir de source de carbone par une voie légèrement différente. Son métabolisme est résumé par une figure :

Dégradation de la taurine

Le deuxième mécanisme est celui des alkane-sulfonates à longue chaîne. Il fait appel à une mono-oxygénase (**SsuD**) associée à une NAD(P)H réductase (**SsuE**) **[82]**. L'oxygénase est flavinique mais appartient à un type particulier, car la flavine n'y est pas logée à demeure comme dans la 4-hydroxybenzoate hydroxylase. La réductase transforme FMN en $FMNH_2$ reconnu comme substrat par l'oxygénase sur un principe répandu chez les *Pseudomonas*. Il s'observe aussi dans la désulfonation du benzène-sulfonate. La même famille d'oxygénases renferme des enzymes actives sur des complexants tels que l'EDTA et le nitrilotriacétate. Toutes les espèces concernées ont un transporteur de type ABC pour faire entrer le substrat dans la cellule.

Mono-oxygénase à FMN

Cette question a son prolongement dans la **désulfuration des hydrocarbures** pétroliers, parce qu'elle met en jeu des enzymes similaires à SsuD. Le soufre est abondant dans le pétrole brut et peut représenter jusqu'à 5% du total en masse.

La majeure partie, soit au moins 60%, est logée dans le dibenzothiophène et ses dérivés. Au cours de la combution des hydrocarbures, le soufre est converti en oxydes corrosifs qui retournent au sol par les pluies acides. De gros efforts ont été déployés pour obtenir une désulfuration par voie biologique. Elle est possible grâce à l'action bactérienne, des *Pseudomonas* et d'espèces Gram-positives. Les premiers tendent à attaquer les noyaux benzéniques par dioxygénation puis ouverture du cycle en *méta* selon le principe que nous connaissons. Les seconds exercent des mono-oxygénations qui conduisent à éliminer le soufre avant attaque des cycles aromatiques. Le schéma représente ici le début de l'attaque par *Rhodococcus erythropolis*, qui est représentatif des germes capables de se multiplier par cométabolisme avec le dibenzothiophène .

Désulfuration du dibenzonthiophène (DBT)

Les trois étapes **[83]** sont codées par l'opéron plasmidique *dszABC*, DszA et DszC étant des mono-oxygénases à $FMNH_2$, DszB une **désulfinase**. L'opéron est soumis à répression par la cystéine, le sulfate et la méthionine, ce qui montre que le substrat est traité par les bactéries comme une source de soufre. Le 2-hydroxybiphényle formé est potentiellement biodégradable par bactéries.

Les composés organosoufrés sont aussi dégradés en **anaérobiose**, mais le mécanisme est mal connu et diffère de ceux que nous avons rencontrés avec les *Pseudomonas* et consorts. *Clostridium pasteurianum* désulfurise le toluène-sulfonate, et *C. beijerincki* s'en sert comme seule source de soufre **[84].** Les sulfonates peuvent aussi servir de donneurs d'électrons au cours de la dénitrification pratiquée par un *Alcaligenes* et *Paracoccus denitrificans* [**85].** Les formes nouvellement isolées comme capables de désulfurer ces substrats appartiennent souvent à des espèces non décrites et l'exploration de cette question nécessitera encore beaucoup de travail **[86]**. Nous voyons en conclusion que la dégradation des sulfates et sulfonates s'intègre facilement aux cycles naturels dont celui du soufre. Leur recyclage s'effectue par voies aérobies et anaérobies, les premières étant de loin les mieux connues.

13.12 - LES PEROXYDASES, UNE ARME ABSOLUE ?

La biodégradation d'une foule de substances est souvent rendue difficile à cause des contraintes exercées sur les enzymes concernées lorsqu'elles sont spécifiques d'une gamme très limitée de substrats, voire d'un seul. Cependant les exceptions ne manquent pas. Citons les cytochromes P450, diverses mono- et dioxygénases,

ou encore des hydrolases. Les peroxydases occupent une place à part. Ces enzymes ubiquistes utilisent le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée, H_2O_2) comme agent d'oxydation, et leur action s'exerce sur une grande variété de cibles. La plupart sont des **protéines héminiques** d'origine végétale, mais existent aussi dans les bactéries, certains champignons et dans les tissus animaux. Les phénols et amines aromatiques figurent parmi leurs nombreux substrats, ainsi que le NADH, le cytochrome c réduit, l'ion chlorure (myéloperoxydase leucocytaire). Des peroxydases à **vanadium** totalement distinctes des précédentes sont connues depuis plus de vingt ans **[87]** et sont spécialisées dans l'oxydation des ions halogénure. On les rencontre chez des algues, champignons et lichens. L'intérêt des peroxydases vient de leurs énormes potentialités, aussi bien dans des cycles naturels fondamentaux que dans le recyclage des contaminants de l'environnement.

Les **peroxydases héminiques** se répartissent en trois groupes : la *classe I* est celle des enzymes d'origine procaryotique [12], la *classe II* est celle des peroxydases fongiques attaquant la lignine, et la *classe III* correspond aux peroxydases sécrétées par les plantes supérieures. Le principe de base est le suivant : l'enzyme commence par s'oxyder avec H_2O_2 en perdant deux électrons qu'il récupère un à un en oxydant chaque fois une molécule de substrat. Le résultat est alors l'apparition de radicaux, qui réagissent deux à deux ou avec d'autres radicaux. Ceci est expliqué par le schéma réactionnel d'une peroxydase (POD), où AH_2 désigne le substrat avant oxydation :

$$\text{POD} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Complexe I} \quad (1)$$

$$\text{Complexe I} + AH_2 \longrightarrow \text{Complexe II} + AH^{\bullet} + H^+ \quad (2)$$

$$\text{Complexe II} + AH^{\bullet} + H^+ \longrightarrow \text{POD} + AH^{\bullet} + H_2O \quad (3)$$

$$AH^{\bullet} + AH^{\bullet} \longrightarrow \text{HA–AH} \quad (4)$$

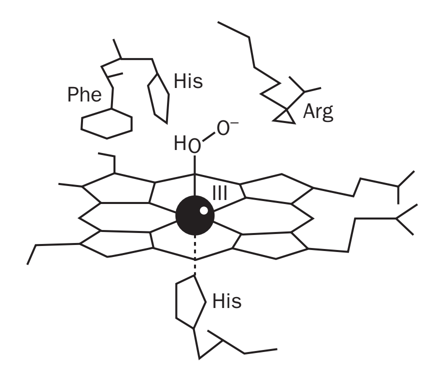
$$\text{Complexe II} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Complexe III (inactif)} + H_2O \quad (5)$$

Seules les réactions (1) à (4) font partie du cycle catalytique normal. La réaction (4) est une dimérisation du radical. Le composé I résulte donc d'une oxydation de l'enzyme à deux électrons, et devient lui-même un oxydant très puissant. De façon générale une peroxydase fait des oxydations électron par électron à partir du composé I, et engendre des produits polymérisés dont le spectre d'absorption est déplacé vers le spectre visible. Les réactions colorées sont nombreuses en fonction des divers substrats et facilitent le dosage de ces enzymes. L'étape (2) voit un électron prélevé sur le substrat, qui est transformé en radical, au profit de l'enzyme qui devient le **complexe II** [13]. Enfin une deuxième molécule de substrat est oxydée (3) avec retour à la POD de départ. Le principe est résumé par quelques schémas.

---

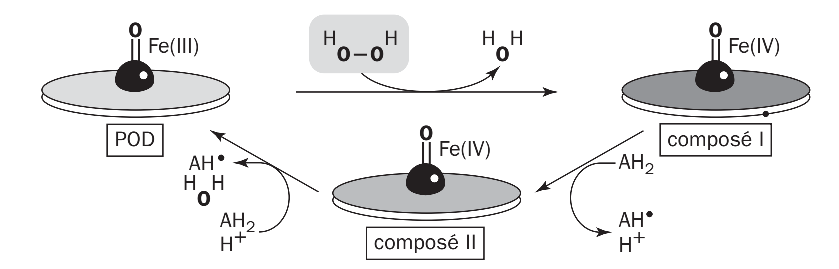
12 - Bactéries, chloroplastes, cytochrome c peroxydase, ascorbate peroxydase du cytosol, glutathion peroxydase.

13 - Les complexes I, II et III sont désignés ainsi comme dans la littérature. Les chiffres romains n'ont rien à voir avec les états d'oxydation du métal, Fe(II), Fe(III), Fe(IV).



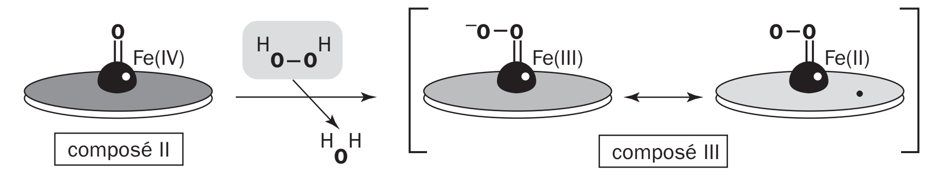
Le fer dans la peroxydase

Au départ, la molécule de H_2O_2 ionisée en HO_2^- se lie au fer en sixième position du côté opposé à l'histidine. La liaison O–O est ensuite scindée par des résidus d'arginine et d'histidine, ce qui libère une molécule d'eau.La première étape (1) est l'oxydation de l'enzyme en composé I, où le fer ferrique Fe(III) est oxydé en Fe(IV) avec formation d'un radical délocalisé entre la porphyrine et des acides aminés de la protéine. Un électron est récupéré sur le substrat au cours du passage au composé II. Une deuxième molécule de substrat permet le retour à l'état initial.



Cycle d'une péroxydase héminique

La réaction (5) est une voie secondaire abortive, conduisant à l'inactivation de l'enzyme. Comme elle part du composé II, cette inactivation par l'eau oxygénée s'effectue seulement en présence d'un substrat, mais elle est plus ou moins réversible en fonction de la nature de celui-ci.



Le Composé III

Ce phénomène est important dans la pratique. Le composé III équivaut à une molécule d'enzyme qui aurait fixé du superoxyde dont la charge est délocalisée. La structure est celle d'une peroxydase dont le métal aurait été réduit en Fe(II), et qui

aurait fixé de l'oxygène diatomique. Ces mécanismes sont connus depuis longtemps dans le cas de la **catalase**. Celle-ci forme aussi un composé I qui oxyde une deuxième molécule de peroxyde et régénère l'enzyme de départ par l'oxydoréduction à 2 électrons, pouvant s'écrire : $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\ H_2O$. Une étape intermédiaire est possible et fait évoluer le composé II en composé III inactif. En somme une catalase est une peroxydase particulière dont le substrat à oxyder est l'eau oxygénée. On sait que les catalases servent d'enzymes de défense contre les peroxydes engendrés par les oxydases flaviniques. Les peroxydases sont aussi des enzymes de défense, et chez l'homme la glutathion peroxydase est un agent important de l'élimination des peroxydes.

Les peroxydases et les catalases ont souvent des mécanismes protecteurs qui tendent à minimiser leur inactivation en composé III. On connaît la structure détaillée d'un certain nombre de peroxydases, dont les plus connues sont la peroxydase du raifort (horseradish peroxidase) **[88]**, la glutathion peroxydase animale, les lignine peroxydases fongiques LiP et MnP, et une enzyme propre à la levure qui est la cytochrome c peroxydase **[89]**. Les catalases les mieux connues sont celles du foie bovin et de *Proteus mirabilis* **[90]**. L'étude physique montre clairement que le radical du composé I n'est pas concentré sur la porphyrine mais passe sur un acide aminé voisin, tryptophane ou tyrosine, à partir duquel s'effectue une chaîne d'échanges de radicaux qui gagne la surface par d'autres acides aminés. Par son Fe(IV) et sa nature radicalaire, le composé I est donc un oxydant puissant particulièrement efficace pour de nombreux substrats à faible masse moléculaire susceptibles d'entrer dans le site actif. Le composé II peut prendre la relève. Sa réactivité est parfois presque équivalente à celle du composé I, généralement un peu inférieure, jamais plus élevée. L'eau oxygénée nécessaire à l'activité des peroxydases provient des oxydases flaviniques, et chez les plantes de l'oxydation de NADPH avec O_2, stimulée par des phénols et les ions manganèse.

Le rôle des peroxydases dans le règne végétal est considérable. L'archétype de ces enzymes est certainement la peroxydase du raifort sur laquelle existe une abondante littérature. Chaque espèce fabrique plusieurs isoformes (ou isoenzymes) intra- et extracellulaires. L'action des peroxydases est prédominante dans la lignification, la subérisation, le renforcement des parois cellulaires, les mécanismes de défense et le contrôle des actions hormonales (auxines, gibbérellines). La fonction physiologique des peroxydases chez les champignons n'est pas toujours bien cernée, mais elles doivent jouer un rôle dans la conquête du milieu environnant et l'invasion des déchets organiques. Les **haloperoxydases** méritent une mention spéciale : elles synthétisent une liaison carbone-halogène dans des cibles organiques. La chloroperoxydase de *Caldariomyces fumago* est héminique tandis que d'autres fonctionnent avec du vanadium. Les haloperoxydases à **vanadium** sont bien représentées dans les algues marines, mais se rencontrent aussi chez les lichens et champignons. Ces enzymes lient l'ion vanadate (VO_4^{3-}) comme cofacteur. Celui-ci ne change pas d'état d'oxydoréduction pendant le cycle catalytique, mais agit comme acide de LEWIS. Contrairement aux peroxydases héminiques, ces enzymes sont stables en présence d'un taux élevé de H_2O_2. Leur mécanisme général implique une oxydation à deux électrons de l'halogénure en acide hypohalogéneux HOX fixé ou non à l'enzyme, réagissant avec une grande variété de substrats nucléophiles AH.

$$H_2O_2 + X^- + H^+ + \text{enzyme} \longrightarrow \text{enzyme-HOX} + H_2O \quad (1)$$

$$\text{enzyme-HOX} \longrightarrow \text{enzyme} + \text{HOX} \quad (2)$$

$$\text{HOX} + \text{AH} \longrightarrow \text{AX} + H_2O \quad (3)$$

Des réactions secondaires sont observées. En absence de substrat halogénable, la bromoperoxydase en présence de bromure catalyse la dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et eau. Un courant de recherche important a été entrepris sur les propriétés et la structure des haloperoxydases. L'application des haloperoxydases à vanadium dans les réactions d'halogénation industrielle est en ligne de mire, d'autant plus que ces enzymes présentent une stabilité bien meilleure que les peroxydases héminiques. Cependant les applications sont freinées par le coût d'isolement de ces enzymes. Parmi les plus étudiées sont les bromoperoxydases de l'algue marine *Ascophyllum nodosum* et de *Xanthoria parietina*, un lichen terrestre de couleur rouge-orangé. Citons aussi la chloroperoxydase du champignon *Curvularia inaequalis*, dont la structure détaillée a été résolue **[91]**. La fonction biologique des peroxydases à vanadium est probablement multiple. Les variations de leur production indique un lien avec les phénomènes de stress. Ces enzymes produisent de l'acide hypochloreux ou hypobromeux agissant vraisemblablement comme bactéricide. Un autre effet, chez les champignons, est l'attaque des parois végétales par oxydation, donnant accès à la cellulose et hémicelluloses. Enfin la production de composés halogénés ayant la valeur d'antibiotiques est un facteur de défense tout à fait probable.

Les peroxydases ont été inventées dans la nature à la fois pour recycler la matière organique de manière expéditive et pour introduire des ions halogénure dans une variété d'accepteurs. Nous sommes loin des enzymes banales qui ne transforment qu'une gamme limitée de substrats, parfois un seul. Les peroxydases rendent possible l'élimination de certains xénobiotiques par une action qui est peut-être accidentelle. Les peroxydases ont dans l'environnement une fonction d'une importance énorme, qui dépasse le cadre de cet ouvrage et qui concerne le cycle du bois. Les plantes continentales utilisent des peroxydases pour synthétiser la lignine, résine de constitution complexe et variable qui entre dans le bois pour une proportion pouvant dépasser 30%. La matière ligneuse représente une masse colossale d'un matériau assez récalcitrant dans la biosphère, contrairement à la cellulose et aux hémi-celluloses qui sont assez rapidement consommées. La lignine est lentement dégradée en produits aromatiques simples par des peroxydases produites par des champignons, l'acteur le plus célèbre étant le *Phanerochaete chrysosporium* de la pourriture blanche du bois (*white-rot*). Ces peroxydases sont principalement LiP et MnP. La seconde fonctionne à l'aide de manganèse. Les peroxydases sont assistées par des **laccases***. Notre environnement se pollue donc tout seul par une masse colossale de déchets sous forme de bois mort, mais il dispose des outils pour y remédier. Cette situation nous sauve de nos propres pollutions par maints produits de notre industrie, parce que les bactéries habituées à faire disparaître les petites molécules issues de la fragmentation de la lignine se sont adaptées à consommer des substrats différents qui leur ressemblent sur le plan chimique.

Les catalases sont présentes dans la majorité des espèces bactériennes aérobies. Ces enzymes peuvent fonctionner dans certaines conditions comme peroxydases. Cette propriété est bien connue par exemple dans le colibacille qui est muni de deux catalases appelées HPI et HPII. La première est une catalase/peroxydase induite par l'eau oxygénée, la seconde est une catalase complexe renfermant des hèmes D. Les catalases et peroxydases ont une grande parenté fonctionnelle et sont utilisées par les bactéries pour se défendre contre les agressions par oxydation provenant des animaux ou des plantes. Les peroxydases sont particulièrement communes dans les espèces pathogènes et participent à la guerre chimique entretenue avec l'hôte par entités oxydantes interposées **[92]**. La présence de peroxydases dans des souches communes de l'environnement commence à intéresser la recherche, car on les soupçonne de pouvoir intervenir dans diverses biodégradations.

CONCLUSION

Ce voyage parmi des exemples de xénobiotiques nous a fait explorer des mécanismes naturels par lesquels ils sont éliminés pour notre plus grand bien. Pour tous ces ingrédients conçus pour servir de pesticides existent des mécanismes biologiques d'élimination, au moins pour ceux dont la mise sur le marché a été autorisée après que le fabricant eut fait la preuve que leur produit était biodégradable, précisément. La fabrication des pesticides les plus variés, vendus sous une foule de désignations commerciales complexes, est une véritable course aux armements pour tenir compte de la variété des situations et compenser la montée des formes de résistance, préoccupante dans le cas de la lutte contre les insectes. Une course au risque d'empoisonner notre environnement et nous-mêmes. Aussi l'étude de ces questions ne fait-elle que se développer.

RÉFÉRENCES

[1] PIMENTEL D (1995) *J. Agricultural Environùental Ethics* **8** : 17-29.

[2] BENNETT GD & ZHENG C (1995) *Applied Contaminant Transport : Theory and Practice,* Van Norstrand Reinhold, N.Y.

[3] HERNER AE, HORNSBY AG & WAUCHOPE RD (1996) *Pesticides Properties in the Environment*, Springer Publishers, N.Y.

[4] FUKUMORI F & HAUSINGER RP (1993) *J. Biol. Chem.* **268** : 24311-24317.

[5] MATRUBUTHAM U & HARKER AR (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 2348-2353.

[6] LEVEAU JH & VAN DER MEER JR (1997) *Gene* **202** : 103-114.

[7] YOU I-S & GHOSAL D (1995) *Molec. Microbiol.* **16** : 321-331.

[8] FILER K & HARKER AR (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 317-320.

[9] LEVEAU JHJ, KÖNIG F, FÜCHSLIN H, WERLEN C & VAN DER MEER JR (1999) *Molec. Microbiol.* **33** : 396-406.

[10] FULTHORPE RR, C. MCGOWAN, O. V. MALTSEVA, W. E. HOLBEN & J. M. TIEDJE. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 3274-3281.

[11] XUN L & WAGNON KB (1995*) Applied Environ. Microbiol.* **61** : 3499-3502.

[12] MÜLLER RH & BABEL W (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 339-344.

[13] PICCOLO A, CONTE P, COZZOLINO A & PACI M (2001) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26** : 70-76.

[14] MATTHES B, SCHMALFUSS J & BÖGER P (1998) *Z. Naturforsch* **53c** : 1004-1011.

[15] LAU EP, NISWANDER L, WARSON D & FALL RR (1980) *Chemosphere* **9** : 565-569.

[16] LAMOUREUX GL & RUSNESS DG (1989) *Pestic. Biochem. Physiol.* **34** : 187-204.

[17] ZABLOTOWICZ RM, HOAGLAND RE, LOCKE MA & HICKEY WJ (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 1054-1060.

[18] LEWIS DL, GARRISON AW, WOMMACK KE, WHITTEMORE A, STEUDLER P & MELILLO J (1999) *Nature* **401**, 898-901.

[19] LE GOFF L (Juillet 2001) Mission *Biotechnologies* de l'association France Nature Environnement, cité par Le Monde Diplomatique.

[20] PARKERGF, HIGGINS TP, HAWKES T & ROBSON RL (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 389-395.

[21] KISHORE GM & JACOG GS (1987) *J. Biol. Chem.* **262** : 12164-12168 ;
WACKETT LP, SHAMES SL, VENDITTI CP & WALSH CT (1987) *J. Bacteriol.* **169** : 710-717.

[22] DICK RE & QUINN JP (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43** : 545-550.

[23] PIPKE R, AMRHEIN N (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1293-1296.

[24] FROST JW, LOO S, CORDEIRO ML & LI D(1987) *J. Amer. Chem. Soc.* **109** : 2166-2171 ;
WANNER BL (1994) *Biodegradation* **5** : 175-184.

[25] LEE KS, METCALF WW & WANNER BL (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 2501-2510.

[26] CHE CM, YE QZ, ZHU Z, WANNER BL & WALSH CT (1990) *J. Biol. Chem.* **265** : 4461-4471.

[27] METCALF WW & WANNER BL (1993) *Gene* **129** : 27-32.

[28] IMAZU K, TANAKA S, KURODA A, ANBE Y, KATO J & OHTAKE H (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 3754-3758.

[29] WACKETT LP, WANNER BL, VENDITTI CP & WALSH CT (1987) *J. Bacteriol.* **169** : 1753-1756.

[30] WATANABE M, SUMIDA N, MURAKAMI S, ANZAI H, THOMPSON CJ, TATENO Y & MURAKAMI T (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 1036-1044.

[31] BUJACZ B, WIECZOREK P, KRZYSKO-LUPICKA T, GOLAB Z, LEJCZAK B & KAVFARSKI P (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 2905-2910.

32] MCGRATH JW, HAMMERSCHMIDT F & QUINN JP (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 356-358.

[33] DUMAS DP, CALDWELL SR, WILD JR & RAUSHEL FM (1989) *J. Biol. Chem.* **264** : 19659-19665.

[34] WALKER AW & KEASLING JD (2002) *Biotechnol. Bioeng.* **78** : 715-721.

[35] BENNING LL, KUO JM, RAUSHEL FM & HOLDEN HM (1995) *Biochemistry* **34** : 7973-7978.

[36] ELASHVILI I, DEFRANK JJ & CULOTTA VC (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 2601-2608.

[37] NAGATA Y, OHTOMOTO R, MIYAUCHI K, FUKUDA M, YANO K & TAKAGI M (1994) *J. Bacteriol.* **176** : 3117-3125 ;

MIYAUCHI K,SUH S-K, NAGATA Y & TAKAGI M (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 1354-1359 ;
NAGATA Y, FUTAMURA A, MIYAUCHI K & TAKAGI M (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 5409-5413 ;
MIYAUCHI K, ADACHI Y, NAGATA Y & TAKAGI M (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 6712-6719.

[38] NAGATA Y, IMAI R, SAKAI A, FUKUDA M, YANO K & TAKAGI M. (1993) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57** : 703-709.

39] MIYAUCHI K, ADACHI Y, NAGATA Y & TAKAGI M (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 6712-6719.

40] HÄGGBLOM MM, RIVERA MD & YOUNG LY (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 1162-1167.

[41] KURITZ T, BOCANERA LV & RIVERA NS (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 3368-3370.

[42] KURITZ T & WOLK CP (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 234-238.

[43] BUMPUS JA, POWERS RH & SUN TA (1993) *Mycol. Res.* **97** : 95-98.

[44] MASSÉ R, LALANNE D, MEISSER F & SYLVESTRE M (1989) *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **18** : 741-752 ;
AISLABIE J, DAVISON AD, BOUL HL, FRANZMANN PD, JARDINE DR & KARUSO P (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 5607-5611.

[45] HAY AG & FOCHT DD (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 2141-2146.

[46] NADEAU LJ, MENN FM, BREEN A & SAYLER GS (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 51-55.

[47] AISLABIE J, DAVISON AD, BOUL HL, FRANZMANN PD, JARDINE DR & KARUSO P (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 5607-5611.

[48] MAULE A, PLYTE S & QUIRK AV (1987) *Pestic. Biochem. Physiol.* **27** : 229-236.

[49] MCALLISTER KA, LEE R & TREVORS JT (1996) *Biodegradation* **7** : 1-40.

[50] WANG H, TIIROLA MA, PUHAKKA JA & KULOMAA MS (2001) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **289** : 161-166.

[51] XUN L, TOPP E & ORSER CS (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 2898-2902.

[52] TOPP E, XUN LY & ORSER CS (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 502-506.

[53] XUN L, BOHUSLAVEK J & CAI M (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **266** : 322-325.

[54] COPLEY SD (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25** : 261-265.

[55] NICHOLSON DK, WOODS SL, ISTOK JD & PEEK D (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 2280-2286.

[56] WU WM, BHATNAGAR L & ZEIKUS JG (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 389-397;
BOUCHARD B, BEAUDET R, VILLEMUR R, MCSWEEN G, LEPINE F & BIAILLON JG (1996) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46** : 1010-1015.

[57] JASPER CJ, EWBANK G, MCCARTHY AJ, PENNINCKX MJ (2002) *J. Appl. Microbiol.* **92** : 127-133.

[58] MOHN WW & TIEDJE JM (1992) *Microbiol. Rev.* **56** : 482-507;
LOUIE TM & MOHN WW (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 40-46.

[59] MADSEN T & LICHT D (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 2874-2878.

[60] SUD RK, SUD AK & GUPTA KG (1972) *Arch. Mikrobiol.* **87** : 353-358 ;
DERBYSHIRE MK, KARNS JS, KEARNEY PC & NELSON JO(1987) *J. Agr. Food Chem.* **35** : 871-876 ;
CHAPALAMADUGU S & CHAUDHRY GR (1991) *Appl. Env. Microbiol.* **57** : 744-750 ;
HASHIMOTO M, FUKUI M, HAYANO K & HAYATSU M (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 1220-1227.

[61] HAYATSU M, HIRANO M & NAGATA T (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 1015-1019

[62] HAMMOUDA O (1999) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44** : 215-219.

[63] DODDAMANI HP & NINNEKAR HZ (2001) *Curr. Microbiol.* **43** : 69-73.

[64] TOPP E, HANSON RS, RINGELBERG DB, WHITE DC & WHEATCROFT R (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3339-3349.

[65] MULLET JE & ARNTZEN CJ (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **635** : 236-248 ; DAYAN FE, VINCENT AC, ROMAGNI JG, ALLEN SN, DUKE SO, DUKE MV, BOWLING JJ & ZJAWIONY JK (2000) *J. Agric. Food Chem.* **48** : 3689-3693.

[66] SEFFERNICK JL, JONHSON G, SADOWSKY MJ & WACKETT LP (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 4247-4252.

[67] DE SOUZA ML, SADOWSKY MJ & WACKETT LP (1998) *J. Bacteriol.* **178** : 4894-4900.

[68] SHAPIR N, OSBORN J, JOHNSON G, SADOWSKY MJ & WACKETT LP (2002) *J. Bacteriol.* **184** : 5376-5384.

[69] WACKETT LP (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci .* **864** : 142-152.

[70] GIARDINA MC, LYKINS BW, GIARDIA MT & FILACCHIONI G (1982) *Agric. Biol. Chem.* **46** : 1439-1445 ; BCHKI R & KHAN S (1986) *J. Agric. Food Chem.* **34** : 746-749 ; BCHKI R & KHAN S (1994) *J. Agric. Food Chem.* **42** : 1237-1241 .

[71] NAGY I, SCHOOFS G, COMPERNOLLE F, PROOST P, VANDERLEYDEN J & DE MOT R (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 676-687 ; NAGY I, COMPERNOLLE F, GHYS K, VANDERLEYDEN J & DE MOT R (1995) **61** : 2056-2060.

[72] CRAWFORD JJ, SIMS GK, MULVANEY RL & RADOSEVICH M (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49** : 618-623.

[73] TRAVKIN V, BASHKUNOV BP, GOLOVLEV EL, BOERSMA MG, BOEREN S, VERVOORT J, VAN BERKEL WJ, RIETJENS IM & GLOVLEVA LA (2002) *FEMS Microbiol. Lett.* **209** : 307-312.

[74] ZEYER J, WASSERFALLEN A & TIMMIS KN (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 447-453.

[75] HINTEREGGER C, LOIDL M & STREICHSBIER F (1994) *J. Basic. Microbiol.* **34** : 77-85.

[76] MURAKAMI S, NAKANISHI Y, KODAMA N, TAKENADA S, SHINKE R & AOKI K (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62** : 747-752.

[77] HUMMERJOHANN J, KUTTEL E, QUADRONI M, RAGALLER J, LEISINGER T & KERTESZ MA (1998) *Microbiology* **144** : 1375-1386.

[78] DODGSON K, WHITE GF & FITZGERALD JW (1982) *Sulfatases of Microbial Origin*, CRC Press, Boca Raton.

[79] VON FIGURA K, SCHMIDT B, SELMER T & DIERKS T (1998) *Bio Essays* **20** : 505-510.

[80] SINGH KL, KUMAR A & KUMAR A (1998) *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14** : 777-779.

[81] EICHHORN E, VAN DER PLOEG JR, KERTESZ MA & LEISINGER T (1997) *J. Biol. Chem.* **272** : 23031-23036.

[82] KERTESZ MA (1999) *Microbiol. Rev.* **24** : 135-175.

[83] GRAY KA, POGREBINSKY OS, MRACHKO GT, XI L, MONTICELLO DJ & SQUIRES CH (1996) *Nature Biotechnol.* **14** : 1705-1709.

[84] CHIEN CC, LEADBETTER ER & GODCHAUX W (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* **129** : 189-193 ; DENGER K, KERTESZ MA, VOCK EH, SCHON R, MAGLI A & COOK AM (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 1526-1530.

[85] DENGER K, LAUE H & COOK AM (1997) *Microbiology* **143** : 1919-1924 ; MIKOSCH C, DENGER K, SCHAFER EM & COOK AM (1999) *Microbiology* **145** : 1153-1160.

[86] COOK AM, LAUE H & JUNKER F (1998) *FEMS Microbiol. Rev.* **22** : 399-419.

[87] BADEN DG & CORBETT MD (1980) *Biochem. J.* **18**7 : 205-211 ;
AHERN TJ, ALLAN GG & MEDCALF DG (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* **616** : 329-339 ;
ALMEIDA M, FILIPE S, HUMANES M, MAIA MF, MELO R, SEVERINO N, DA SILVA JA, FRAUSTO DA SILVA JJ & WEVER R (2001) *Phytochemistry* **57** : 633-642.

[88] HENRIKSEN A, SMITH AT & GAJHEDE M (1999) *J. Biol. Chem.* **274** : 35005-35011.

[89] POULOS TL & KRAUT J (1980) *J. Biol. Chem.* **255** : 8199-8202.

[90] KIRKMAN HN & GAETANI GF (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81** : 4343-4347 ;
GOUET P, JOUVE HM & DIDEBERG O (1995) *J. Mol. Biol.* **249** : 933-954.

[91] MESSERSCHMIDT A & WEVER R (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** : 392-396.

[92] MILLER RA & BRITIGAN BE (1997) *Clin. Microbiol. Rev.* **10** : 1-18.

Chapitre 14
La circulation des métaux

L'arsenal chimique moderne pour lutter contre les ravageurs de toute nature est devenu immense. L'époque est révolue, du moins on ose l'espérer, où l'on pouvait répandre n'importe quoi sans trop se soucier de l'environnement. Les micro-organismes viennent une fois de plus à notre secours pour corriger les excès. Mais la variété des structures chimiques à dégrader est très grande. Ce chapitre ne tente pas d'examiner toutes les possibilités, ce qui serait impossible, mais se focalise sur quelques exemples typiques des herbicides et des insecticides courants. Quelques-uns ont déjà été interdits à l'emploi dans un certain nombre de pays, mais contaminent encore les sols et les chaînes alimentaires. Le but est ici d'examiner diverses formulations chimiques biodégradables, et d'attirer l'attention le cas échéant sur celles qui sont récalcitrantes à toute action biologique.

14 – La circulation des métaux

La circulation des métaux, et les transformations cycliques de certains d'entre eux, participent aux équilibres de la biosphère et interviennent à tous les niveaux du développement des organismes. Il ne peut y avoir de regard sur les biotransformations de l'environnement sans tenir compte de leur présence et de leurs effets. Les métaux ne sont pas seulement nécessaires à tout métabolisme cellulaire, mais leur accumulation empêcherait toute survie microbienne si les cellules n'avaient pas des dispositifs pour s'en défendre. Les bactéries sont armées pour contrôler très efficacement le taux des différents métaux qu'elles contiennent. Les métaux retenant particulièrement notre attention seront le fer, le cadmium, le zinc, le plomb, le cuivre et le mercure, ainsi que l'arsenic et l'antimoine.

14.1 - Gérer le taux de métal

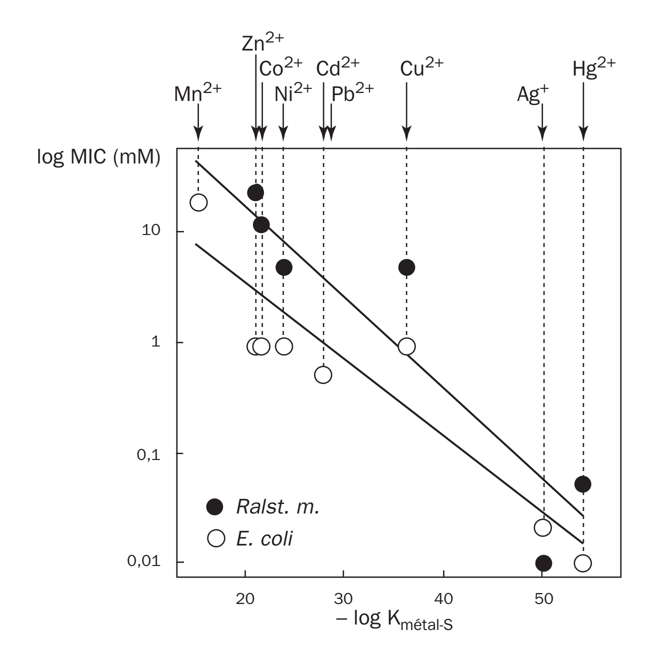
Pour les cellules vivantes, de nombreux métaux sont infiniment plus précieux que le platine, l'or et l'argent, mais tous n'ont pas la même valeur pour leur fonctionnement. Les plus importants comme cofacteurs des enzymes sont sous forme de cations divalents. On désigne empiriquement comme "métaux lourds" ceux qui appartiennent à la quatrième ligne de la classification périodique et au-delà, en partant du titane et du vanadium [1]. Les monovalents tels que Na^+ et K^+ en sont exclus, ainsi que les cations divalents "légers" tels que Mg^{2+} et Ca^{2+}. Les cations des métaux lourds sont les seuls que nous évoquerons dans ce chapitre. Il sera facile de repérer leur position dans la classification périodique, si bien qu'il n'a pas été jugé utile de la reproduire *in extenso* puisqu'elle figure dans tous les livres de chimie. Ont été soulignés les métaux d'intérêt biologique et environnemental, soit comme cofacteurs, soit comme poisons. L'arsenic ne fait pas partie des métaux à proprement parler, mais présente avec eux des analogies, tout comme l'étain, le plomb et le bismuth. Certains éléments métalliques ont une importance biologique par leurs oxydoréductions. Les plus importants sont le manganèse, le fer, le cobalt, le nickel et le cuivre. Le vanadium, le molybdène et le tungstène (W) interviennent comme nous le savons dans le cycle de l'azote dans le cycle de l'azote.

---

1 - L'expression « métaux lourds » ne correspond à aucune définition rigoureuse. En principe ce sont les métaux dont la densité à l'état pur est d'au moins 4 ou 5.

												B	C	N	O	F
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl
K	Ca			V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn			As	Se	Br
	Sr				Mo					Ag	Cd		Sn	Sb		I
					W						Hg		Pb	Bi		

Comment les ions métalliques sont-ils reconnus par les molécules biologiques ? Parmi les critères sont la charge, la taille ionique, la sphère d'hydratation et l'établissement de coordinences avec les structures organiques. Des atomes d'oxygène, d'azote et de soufre se placent fréquemment autour des cations métalliques les plus légers, mais le soufre est le donneur préféré pour les cations les plus volumineux comme ceux du mercure et du plomb. Ce critère n'est pas automatique. Le plomb se lie volontiers à l'oxygène. La stabilité d'un complexe est augmentée si la molécule organique partenaire se replie de façon à respecter exactement la géométrie de coordination du métal. La spécificité de liaison entre une protéine et un cation métallique n'est pas toujours tranchée. Un métal peut alors en remplacer un autre et affecter l'activité biologique de la protéine. Il en résulte des effets toxiques plus ou moins importants. Les métaux s'entourent de quatre, cinq ou six coordinences qui peuvent être complétées par des molécules d'eau pour former un complexe dont la géométrie est guidée par l'orientation des orbitales métalliques et la nature des atomes donneurs.



Le tableau établi d'après DIETRICH NIES à Halle en Allemagne, montre la corrélation entre la concentration inhibitrice minima (MIC) et la solubilité du sulfure correspondant, mesurée par la constante d'affinité K du métal pour le soufre. Les ions les

plus toxiques sont repérés vers le bas et à droite. La comparaison entre *Ralstonia* et le colibacille montre que le premier est globalement plus résistant, sauf pour l'argent. Le fer est un cas particulier et a été laissé à part. On pense que la toxicité des métaux s'explique en partie par leur capacité de se combiner avec les thiols du glutathion ou des protéines. La corrélation indiquée ici suggère que c'est bien un des facteurs possibles.

La tolérance d'un organisme à un excès de métal s'appuie sur l'absence fortuite de tout dégât important au niveau des protéines cellulaires. Une résistance est au contraire un phénomène actif mettant en jeu des transporteurs actionnés par une source d'énergie. La résistance des bactéries comme *Ralstonia metallidurans* à un stress métallique peut être considérable. Ces germes peuvent survivre à des taux élevés de pollution métallique au voisinage d'installations industrielles ou minières.

Les cations les plus abondants dans la cellule sont ceux du magnésium. Il en faut environ 100 fois plus que de zinc. Le magnésium représente à lui seul environ 1% du poids sec de la bactérie. C'est énorme, et le magnésium n'a des effets toxiques qu'à des niveaux très élevés. Pour trouver et accumuler les ions Mg^{2+}, les bactéries disposent d'un transporteur désigné par **CorA**. Une mutation au niveau de cette protéine provoque une carence en magnésium qui est imparfaitement compensée par d'autres transporteurs qui amènent aussi du magnésium. Dans les conditions normales, CorA fait entrer en même temps des ions Co^{2+} et Ni^{2+} qui peuvent se trouver en excès dans le milieu cellulaire. La disparition de CorA rend secondairement les cellules tolérantes au cobalt et au nickel extérieurs puisque ces derniers ne pénètrent plus aussi facilement. Cet exemple montre qu'il faut s'attendre à des interférences biologiques complexes entre les différents métaux de l'environnement.

Les métaux qui nous intéressent ici sont pour l'essentiel le plomb, le mercure, le cadmium, le cuivre, le zinc et les métaux dits de transition : fer, cobalt nickel. Ils interviennent dans le monde vivant essentiellement sous forme de cations, malgré quelques exceptions par association avec l'oxygène comme dans les anions molybdate et vanadate. Divers métaux sont indispensables aux organismes vivants comme cofacteurs de catalyse enzymatique ou d'oxydoréduction, ou encore pour stabiliser les macromolécules et membranes. Des mécanismes de pompage assurent l'entrée et la sortie des ions métalliques de telle sorte que leur concentration à l'intérieur des cellules soit optimisée.

14.2 - LE FER - UN MÉTAL ESSENTIEL

Le fer est présent dans l'environnement sous forme d'oxydes, de carbonates, de sulfures et d'hydroxydes, dans des solides cristallisés ou amorphes. Il est en grande partie séquestré par des éléments minéraux ou organiques du sol (argiles, humus). Citons pour mémoire l'hématite (Fe_2O_3), la sidérite ($FeCO_3$), la pyrite (FeS_2). Le tableau suivant récapitule quelques interventions du fer en biochimie :

Fonction	*Protéines héminiques*	*Protéines non héminiques*
Transport d'électrons [Fe(II) ↔ Fe(III)]	Cytochromes a, b, c	Protéines fer-soufre, ferrédoxines, rubrédoxine
Oxydoréductions	Flavocytochromes	Divers complexes flaviniques
Fixateur de O_2 [Fe(II)]	Hémoglobines, myoglobine	Hémérythrine
Métabolisme de H_2		Hydrogénases
Elimination d'O_2^-		Superoxyde dismutases à Fe
Peroxydases [Fe(III)]	Catalases, peroxydases	
Oxygénation [Fe(III), Fe(II)]	Mono-oxygénases type P450, dioxygénases	Mono-oxygénases, dioxygénases
Respiration	Cytochromes respiratoires terminaux	Ribonucléotide réductase
Réduction du nitrite	Nitrite réductase à Fe	NO réductase
Régulation des gènes	Capteur d'O_2 type FixL	Fur, FNR

Malgré son abondance dans la biosphère, le fer est inégalement réparti et peu mobilisable quand il est sous forme d'oxydes et d'hydroxydes très insolubles. On peut se représenter assez facilement la formation d'un hydroxyde de ce genre. Le métal s'entoure de 6 molécules d'eau formant un complexe hydraté comme l'indique le dessin. Le départ d'un proton correspond à un pKa de l'ordre de 3, donc rapide à pH neutre et encore plus rapide si le pH s'élève. La base conjuguée formée se lie à un autre complexe formant un dimère, qui perd à son tour un autre proton, et ainsi de suite, formant des précipités d'hydroxydes métalliques contenant des milliers d'atomes de fer.

Un tel "polymère" n'est récupérable par les êtres vivants qu'en émettant des complexants dont l'affinité pour le Fe(III) est assez élevée pour entraîner la dissociation des hydroxydes et composés similaires. Les micro-organismes carencés en fer développent une réaction de stress et produisent à cet effet des petites molécules organiques appelées **sidérophores**. Il existe une extraordinaire variété de ces substances, toutes habilitées à fixer le Fe(III) avec une très grande efficacité. Les sidérophores sont captés par des récepteurs appropriés à la surface des cellules. Les procaryotes n'en ont pas l'exclusivité, car les champignons et les plantes en produisent également. Les formules représentent trois sidérophores appartenant à des catégories communes. L'aérobactine est produite par *Aerobacter aerogenes*, et a été trouvée chez un colibacille porteur d'un plasmide (pColV). Les deux autres sidérophores piègent le fer par des motifs du type catécholate, disposés sur un cycle trilactone dans l'entérobactine, appelée aussi entérochéline. Les *Pseudomonas*

font des sidérophores particuliers comme la pyochéline. Ces différents produits ont une affinité énorme pour le fer et servent de modèles à la synthèse de nouveaux complexants artificiels **[1]**.

Aérobactine

Entérobactine

Pyochéline

Sidérophores

Comment expliquer une telle multiplicité de moyens naturels ? Des récepteurs particuliers à ces produits existent à la surface des cellules qui les produisent et cherchent peut-être à en garder l'exclusivité. De nombreuses espèces de l'environnement parmi les *Pseudomonas*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Mycobacterium* et beaucoup d'autres sont des pathogènes opportunistes. Par exemple *Pseudomonas aeruginosa* carencé en fer émet deux sidérophores, une pyoverdine et une pyochéline, reconnues séparément par les récepteurs FpvA et PptA. Les pyoverdines sont des produits caractéristiques des *Pseudomonas* fluorescents. Leur structure est de nature peptidique contenant des acides aminés particuliers qu'on ne trouve pas dans les protéines. Le dessin montre la structure d'une pyoverdine et montre comment le produit se referme autour du fer **[2]** par des groupes de type hydroxamate et catécholate.

Pyoverdine

Tout agent infectieux doit récupérer du fer en conditions difficiles car le métal est déjà accaparé par les molécules organiques variées de l'hôte et s'y trouve

fermement lié. Un arsenal de sidérophores, récepteurs et transporteurs divers permet de s'attaquer au problème dans toutes les conditions de pH, et d'environnement moléculaire **[3]**. En outre les sidérophores émis par une population bactérienne sont facilement piratés par d'autres espèces, et font l'objet d'une véritable compétition. Malgré son abondance dans la biosphère, le fer est parfois difficile à récupérer, soit parce qu'il est sous forme d'oxydes hautement insolubles, soit parce qu'il est déjà étroitement séquestré sous forme de complexes organiques. La complexité de ces outils a cependant l'inconvénient physiologique d'exiger des voies de synthèse onéreuses pour de très petites quantités de produit. Aussi la production des sidérophores est-elle régulée. Les gènes disposés en opérons sont réprimés dès que la teneur du fer dans le milieu dépasse 10 µM, ou dès que Fe(II) est excédentaire dans la cellule.

Les ressources en fer sont souvent limitantes en milieu océanique. Les recherches essaient d'évaluer ce facteur dans l'hypothèse du réchauffement climatique. En effet on admet que les océans contiennent de vastes réservoirs de phytoplancton susceptible d'éponger une partie du CO_2 de l'atmosphère. Parmi les formes vivantes figurent en nombre immense les cyanobactéries et les diatomées. Une prolifération de diatomées a été observée dans les mers australes après un épandage expérimental de ressources en fer **[4]**. D'autres analyses effectuées dans les mers chaudes ont montré que le fer était retenu soit par des sidérophores, soit par des matières organiques de décomposition comprenant des porphyrines et leurs produits d'altération. Il y a compétition au sein du microplancton pour ces ressources. La récupération du fer paraît utiliser deux stratégies distinctes. Les cyanobactéries privilégient l'absorption du fer à partir des sidérophores libres et variés que les micro-organismes pélagiques libèrent. Les *Synechococcus*, par exemple, peuvent détourner les sidérophores produits par d'autres espèces, mais sont relativement impuissants à utiliser le fer attaché aux porphyrines. Diverses cyanobactéries sont relativement bien armées pour utiliser le fer minéral. La situation est différente pour les diatomées qui sont des eucaryotes. Elles réduisent le fer à l'état ferreux par une ferriréductase et peuvent l'assimiler de préférence à partir des porphyrines. On a découvert que des réactions photochimiques participent à la circulation du fer océanique. Les **aquachélines** sont des sidérophores émis par *Halomonas aquamarina*, une espèce isolée sur la côte ouest de l'Afrique équatoriale à profondeur moyenne. Une oxydoréduction en lumière ultraviolette décompose les complexes Fe(III)-aquachélines en libérant du Fe(II) plus mobile, facilitant la circulation du métal en milieu océanique **[5]**. La disponibilité du fer est donc un facteur critique pour le développement des espèces biologiques en général. Les végétaux en ont besoin pour bâtir leur photosynthèse. Toute carence chez les plantes s'accompagne d'ailleurs du jaunissement des feuilles et du phénomène de chlorose, bien connu des jardiniers et horticulteurs. Les protéines du type ferritine sont les réservoirs de fer les plus courants. Il est transporté dans le règne animal par la transferrine et la lactoferrine.

Comment le fer entre-t-il dans les bactéries ? Les sidérophores chargés de leur métal sont captés par des récepteurs et pénètrent à l'aide de porines. Le fer est alors libéré par plusieurs procédés. L'un d'eux est une hydrolyse enzymatique du sidérophore, ce qui a pour effet de gommer sa haute affinité. Une autre solution est la

réduction en Fe(II) par une fer réductase flavinique [**6**]. Le colibacille possède une panoplie complexe d'outils et la production des transporteurs du fer est réglée par le répresseur **Fur** (*ferric uptake regulator*) **[7]**, qui ne contrôle pas moins de cinq systèmes d'entrée du fer, soit un ensemble de gènes et d'opérons formant un régulon. Fur est un polypeptide de 148 acides aminés dont la séquence N-terminale riche en histidine est apparemment la portion qui lie un cation divalent. Une autre partie lie les ions Zn^{2+}. Cette protéine examinée en RMN se lie à l'ADN sous forme d'un dimère, sur une séquence spécifiquement reconnue appelée "boîte Fur". placée en amont des gènes que Fur vient réguler négativement **[8]** : en cas d'abondance du fer, elle inhibe la transcription des gènes placés en aval. Ce type de contrôle a été mis en évidence chez de nombreuses espèces libres ou pathogènes [**9**]. Dans *Bacillus subtilis*, la protéine Fur ne réprime pas moins de 39 gènes contenus dans 20 opérons **[10]** !

Pourquoi le fer cellulaire est-il aussi soigneusement séquestré par les êtres vivants malgré son abondance naturelle ? On pense qu'il s'agit d'une parade à la toxicité potentielle de ce métal, qui catalyse en solution la célèbre **réaction de FENTON**, une calamité des environnements aérobies :

$$H_2O_2 + O_2^{-} + H^+ \longrightarrow H_2O + OH^{\bullet} + O_2$$

Le peroxyde et le superoxyde sont produits par les oxydases. Le premier est réduit par le second et génère le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$, extrêmement réactif sur de nombreuses cibles organiques dont l'ADN. En présence de fer la réaction se décompose en deux temps :

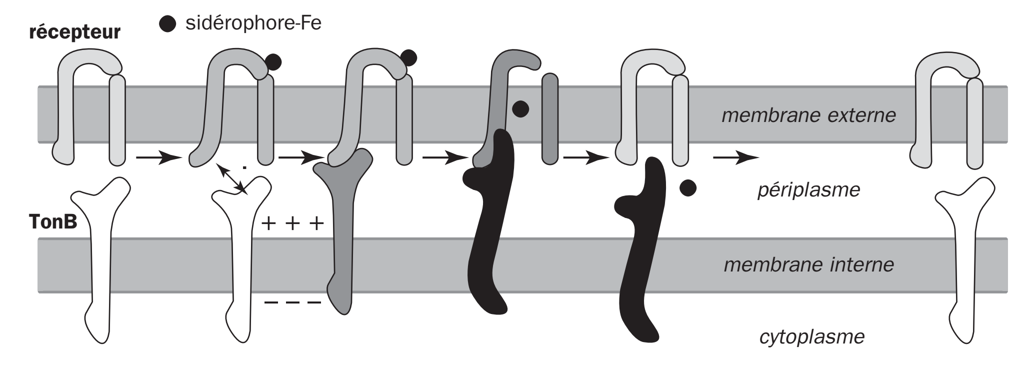
$$Fe^{3+} + O_2^{-} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow Fe^{3+} + H_2O + OH^{\bullet}$$

En oscillant entre les deux niveaux d'oxydation, les ions du fer catalysent la réaction de Fenton et la rendent beaucoup plus intense. L'immobilisation du fer dans des molécules organiques au sein de porphyrines ou d'enzymes variées relève d'une stratégie anti-Fenton. La disparition du fer libre est alors vécue par les germes infectieux comme un état de stress. Certains facteurs de virulence répondent à cette forme de crise. Ils induisent des toxines, des enzymes hémolytiques et d'autres éléments guerriers susceptibles de faire des dégâts chez l'hôte afin d'en arracher le fer !

Revenons à l'entrée du fer dans les cellules. Lié à son sidérophore, il est pris en charge par un récepteur membranaire avant d'être propulsé vers l'intérieur par un pompage approprié. Le problème est rendu plus compliqué dans les bactéries Gram-négatives à cause de l'existence des deux membranes. La plus externe se laisse traverser plus ou moins passivement par des molécules et ions variés, par le jeu des ***porines****. Le diamètre d'ouverture de celles-ci ne permet pas le passage des sidérophores, qui sont reconnus par un récepteur logé dans la membrane externe. Or le passage vers le périplasme nécessite un couplage énergétique, et c'est la membrane interne qui détient le potentiel électrochimique (Δp). Il faut donc un dispositif spécial pour transmettre l'énergie d'une membrane à l'autre. C'est le facteur **TonB** qui s'en charge. Cette protéine forme un pont entre les deux membranes et entre en contact avec le récepteur. Un dessin imagé évoque des changements de conformations actionnés par le potentiel de membrane, permettant au complexe

sidérophore d'être déchargé dans le périplasme. Le modèle simplifié, imité de MOECK ET COULTON **[11]**, est le suivant. Le récepteur (FepA chez *E. coli*) fixe le complexe avec une forte affinité, subit un petit changement de nature allostérique qui attire TonB, planté dans la membrane interne. TonB est sous une conformation porteuse d'énergie. Le contact avec le récepteur lui permet de se vider de cette énergie sur le récepteur qui change de conformation en perdant sa haute affinité pour le complexe. Celui-ci trouve alors une porte ouverte sur le périplasme, tandis que les deux protéines reprennent leur état initial. L'action de TonB oblige le récepteur à lâcher sa proie, qui serait autrement retenue avec une telle affinité que le métal resterait à la surface de la cellule.



Action de TonB

La transduction de l'énergie par TonB se fait en association avec deux autres protéines membranaires, ExbB et ExbD. La machinerie importatrice TonB + ExbB + ExbD se retrouve sous une forme similaire chez diverses espèces Gram-négatives et ses effets s'exercent dans plusieurs directions. La première est l'importation du fer véhiculé par des sidérophores, également apporté par des molécules organiques telles que les porphyrines. Cette propriété est d'importance, car elle permet aux espèces pathogènes d'arracher le fer à leur organisme hôte, en utilisant notamment l'hème provenant de la destruction de l'hémoglobine et des cytochromes. Elle a été mise en évidence notamment dans *Neisseria meningitidis* **[12]**. La seconde action de TonB est de faciliter l'importation de molécules telles que la vitamine B12, trop volumineuse passer directement à travers une porine, mais reconnue par un récepteur. Son entrée pose un peu le même problème que celle du fer, car la vitamine est récoltée à dose très faible et doit être piégée avec haute affinité. Une troisième intervention de TonB est dans l'entrée de bactériophages et de protéines spéciales comme les *colicines**. Enfin TonB possède une fonction qui n'est pas celle d'un importateur, mais d'un outil de signalisation : l'occupation de récepteurs à la surface de la cellule par leur ligand est détectée et signalée à l'intérieur du cytoplasme aux protéines régulatrices de l'expression des gènes.

Comment le fer entre-t-il ? Il est pris en charge par un mécanisme tirant son énergie de l'hydrolyse de l'ATP et fondé sur un ***transporteur ABC****. L'entrée de l'entérobactine de *E. coli* en offre un exemple. Elle est assurée par le système FepBCDG. La première opération est la prise en charge du complexe libéré par FepA dans le périplasme afin de le conduire à la membrane. Ce rôle revient à FepB, une protéine

périplasmique qui est nécessaire à l'importation du fer par entérobactine **[13]**. L'étape suivante est la plus importante : le passage à travers la membrane assuré par les protéines FepD et FepG. Le complexe est tiré vers le cytoplasme grâce à une dépense d'énergie. La protéine responsable du couplage est FepC, une ATPase attachée à la face interne de la membrane. Le système FepDGC forme ce qu'on appelle une perméase, un transporteur spécifique unidirectionnel actionné par une source d'énergie.

Le fer dont la cellule a besoin doit se trouver à l'état de Fe(II). Comment celui-ci est-il libéré ? Le passage de Fe(III) à Fe(II) implique une réduction. Celle-ci détache le métal du sidérophore, parce que celui-ci a n'a une affinité élevée que pour le fer oxydé, non pas pour Fe(II). Un autre mécanisme observé dans certains transports du fer consiste à hydrolyser le sidérophore, ce qui fait disparaître son pouvoir. Une fois libéré dans le cytoplasme, le fer est immédiatement disponible pour le métabolisme cellulaire, mais sa présence est détectée par des protéines régulatrices. La **protéine Fur**, évoquée dans la section précédente, tient ce rôle dans les entérobactéries et contrôle de nombreux gènes concernés par l'approvisionnement en fer. Tout excédent en métal se traduit immédiatement par une répression des gènes codant pour les sidérophores et les protéines de transport. La protéine Fur ne fait pas que cela. Les mutants sur le gène *fur* cessent de croître sur diverses sources carbonées, ce qui suggère l'existence d'interactions complexes. De grands efforts de recherche sont déployés tous azimuts pour mieux les comprendre, car ces questions intéressent autant l'agriculture et la défense de l'environnement que la santé.

14.3 - QUELQUES MÉTAUX INDISPENSABLES

L'importance des métaux dans l'environnement et leurs répercussions sur les biodégradations ne se limitent pas au cas du fer. Et le **cuivre** ? Il est généralement toxique à faible taux, mais intervient de manière essentielle dans des systèmes enzymatiques importants. Voici quelques exemples :

Protéines à cuivre (cuproprotéines)	*Fonction*
Cytochrome c oxydases, quinol oxydases	Avec porphyrines, catalyse la réduction d'O_2 en H_2O sur un site bi-métallique Fe/Cu
Superoxyde dismutases à Zn/Cu	Catalyse la dismutation du superoxyde en O_2 et H_2O_2
Ammoniac mono-oxygénase	Participe à la nitrification des sols
Méthane mono-oxygénase	Mono-oxygénase membranaire des méthanotrophes
Nitrite réductase à Cu	Réduction du nitrite dans la dénitrification
Laccase	Oxydation des phénols chez les végétaux
Oxydases	Oxydation des amines et du galactose
Tyrosinase	Oxydation de la *L*-tyrosine en *DOPA**
Hémocyanine	Transport d'O_2 (mollusques).
Azurine, amicyanine	Transporteurs d'électrons chez les bactéries
Plastocyanine	Transporteur d'électrons dans la photosynthèse

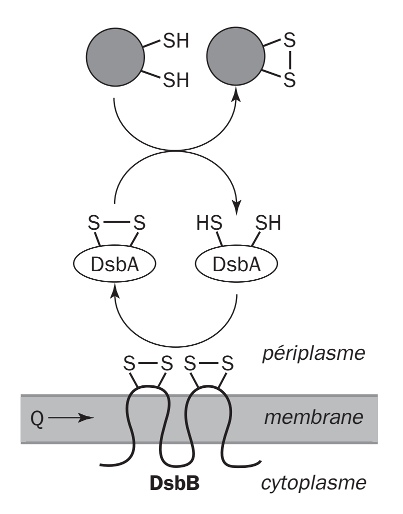
D'autres métaux ont des fonctions vitales particulières et certains cations peuvent changer de niveau d'oxydation. Ceux qui sont liés aux protéines sont parfois remplaçables par d'autres cations de même type, comme le zinc par le cobalt, le nickel ou le cadmium, mais la substitution s'accompagne d'une diminution d'activité biologique et même d'une inhibition complète, expliquant les effets toxiques constatés. Un tableau simplifié rappelle quelques propriétés courantes.

Métal	*Propriétés essentielles*
Nickel	CO-déshydrogénase anaérobie (acétyl-CoA synthase), diverses hydrogénases, cofacteur F430 de la méthanogénèse, uréase.
Cobalt	Métal présent dans la vitamine B12 et caractéristique des corrinoïdes. Oscille entre les états Co(I), Co(II), Co(III), avec changements de la géométrie de coordination. Une liaison directe carbone-cobalt se forme sur Co(I), avec passage à Co(III), rompue inversement par réduction. Méthyltransférases : synthèse de CH_3–CoM dans la méthanogenèse, acétyl-CoA synthase, méthionine synthase. Réactions radicalaires : réduction des ribonucléotides chez divers anaérobies, réarrangements (succinate en malonyl-CoA dans la fermentation propionique).
Molybdène	Dans un noyau fer-soufre spécial de la nitrogénase, ou lié à un cofacteur nucléotidique du type MGD dans les nitrate réductases, la DMSO réductase, la TMAO réductase et les molybdoprotéines (xanthine oxydase, formiate déshydrogénase, CO déshydrogénase). Son degré d'oxydation varie entre Mo(IV) et Mo(VI). Il est quelquefois remplacé ou remplaçable par du vanadium ou du tungstène.
Zinc	Possède une double fonction, comme stabilisateur de la structure des protéines, comme élément catalytique dans les enzymes où il est retenu avec une très haute affinité, sans changer d'état d'oxydation (Zn^{2+}). Anhydrase carbonique, des hydrolases (parmi les RNases et peptidases, phosphatase alcaline), certaines déshydrogénases (alcool déshydrogénase à Zn), aldolases de classe II.
Manganèse	Noyau à 4 Mn dans PS2 de la photosynthèse oxygénique où H_2O est le donneur d'électrons. Mn^{2+} dans les phosphotransférases, ARN-polymérase procaryotique, glutamine synthétase, arginase, concanavaline A (une lectine), peroxydase MnP. Peut entrer dans un cycle d'oxydoréduction entre Mn^{2+}, Mn^{3+} (très oxydant), et Mn(IV) (dans MnO_2). Ce dernier intervient comme accepteur dans une respiration anaérobie. La présence de Mn est facilement détectable par RPE.
Magnésium	Ne change pas de niveau d'oxydation (Mg^{2+}), indispensable aux transformations des nucléotides à adénine (ATP, ADP). Hexokinase, diverses phosphotransférases et hydrolases. Cofacteur de la Rubisco après y avoir été introduit par une réaction d'activation. Stabilisateur des ribosomes et de la paroi bactérienne.
Calcium	Stabilisateur et activateur de nombreuses protéines sous forme de Ca^{2+} sans changer de niveau d'oxydation, coordonné typiquement par des groupes carboxyliques (glutamate, aspartate). Le calcium intracellulaire libre (de 0,1 à 1 µM est un régulateur métabolique fondamental dont le taux est régulé de manière complexe, avec la participation de la pompe à calcium, qui est une ATPase catalysant son rejet hors de la cellule. Le calcium se lie avec une haute affinité avec la tubuline, intervient dans l'adhérence entre cellules, est indispensable à la contraction des fibres musculaires, à la division cellulaire… Un des matériaux de base pour la construction des squelettes et coquilles.
Sodium	Na^+, participe à la régulation de la pression osmotique intracellulaire, à la polarisation de la membrane (ATPase Na/K des eucaryotes), au fonctionnement de transporteurs.
Potassium	K^+, comme le sodium, activateur spécifique de certains transporteurs et enzymes (pyruvate phosphokinase, tryptophanase).

La plupart des métaux cités sont souvent toxiques à faible dose lorsqu'ils génèrent des réactions secondaires ou inactivent des enzymes clés du métabolisme. Le cuivre est dans ce cas. D'autres métaux tels que le chrome, l'étain, le plomb, le cadmium, l'uranium et le mercure sont à l'origine de pollutions industrielles ou minières néfastes, et n'ont pas de fonction biologique particulière. L'antimoine, le bismuth et l'arsenic sont à mettre en renfort. La pollution par les métaux est parmi les plus difficiles à traiter, car au contraire des molécules organiques dont la structure est scindée ou modifiée, ils ne sont pas transmutables en d'autres éléments, seulement oxydés ou réduits, immobilisés par séquestration ou poussés un peu plus loin. Le mercure est un cas particulier car il est volatil à l'état métallique et peut s'échapper dans l'atmosphère où il figure à l'état de traces.

La plupart des organismes sont amenés à se défendre contre un excès d'ions métalliques. Une méthode usuelle consiste à les neutraliser par séquestration avec des molécules organiques. Les **métallothionéines** font partie d'un tel système de défense. Ces petites protéines sont présentes chez les eucaryotes, ainsi que dans divers procaryotes. Elles sont remarquables par leur teneur élevée en cystéine et sont induites comme protéines de stress servant à lier des cations métalliques divalents (zinc, cadmium) **[14]**. Ces protéines n'ont en moyenne que 61 acides aminés chez les animaux. Elles sont dépourvues d'acides aminés aromatiques et la cystéine y figure une vingtaine de fois. Des métallothionéines ont été décrites chez les plantes et champignons les plus divers, ainsi que dans certains procaryotes. L'abondance de cystéine et des séquences consensus permet de les repérer facilement. Ainsi chez les ascomycètes, le consensus est C-x-K-C-x-C-x(2)-C-K-C dans 55-56 acides aminés renfermant aussi le motif CCC. Chez les procaryotes dont les cyanobactéries, le consensus est K-C-A-C-x(2)-C-L-C dans une séquence de 53-56 acides aminés. La présence des métallothionéines dans les cyanobactéries n'est pas vitale, comme le montre la sélection de mutants qui en sont dépourvus et restent pourtant parfaitement viables, mais deviennent très sensibles à l'empoisonnement par les sels de zinc ou de cadmium.

Quelle est la fonction réelle des métallothionéines ? Elle est double. Elles offrent d'abord une protection contre le zinc et divers métaux en excès. La deuxième fonction est le stockage des métaux essentiels afin de constituer un réservoir où la cellule peut puiser à la demande. Or l'expression des gènes dépend couramment de protéines régulatrices contenant du zinc stocké dans la métallothionéine sur des thiols voisins. L'oxydation de ces thiols pour former un pont disulfure (–S–S–) se fait avec un potentiel relativement bas (– 360 mV) et libère le cation. La synthèse des métallothionéines est généralement augmentée en présence de concentrations métalliques élevées, et leur taux est ajusté de manière précise au cours du développement. Ainsi les mammifères possèdent deux métallothionéines voisines, appelées I et II, qui maintiennent un stock de cuivre et de zinc nécessaire aux tissus à croissance rapide (en particulier pendant la vie fœtale), tout en servant de rempart en cas d'intoxication par des métaux comme le cadmium ou le mercure.



La recette fondée sur l'oxydoréduction des thiols s'applique aux **thiorédoxines**. Ces petites protéines d'environ 12 kDa fonctionnent dans la réduction du ribose des nucléotides[2] et sont des transporteurs d'électrons à la manière des ferrédoxines, mais sans avoir de noyau fer-soufre. Elles fonctionnent par oxydation réversible en pont disulfure de la structure C-x-x-C porteuse de thiols voisins. On sait que les liaisons de ce type affectent généralement des protéines destinées à être exportées hors de la cellule, et contribuent à les stabiliser.

Oxydoréduction par dithiols

Cette question a fait l'objet d'études détaillées chez dans le colibacille. La confection des ponts disulfures est sous la dépendance de la paire de protéines DsbB/DsbA **[15]**, munies l'une et l'autre des sites dithiols soumis à oxydoréduction. La protéine DsbB est membranaire et se trouve à l'état oxydé en quasi-permanence. Elle oxyde à son tour DsbA, dont le site dithiol C-x-x-C forme alors un pont disulfure. DsbA oxyde à son tour une cible périplasmique (cercle gris). DsbB est réoxydé par la chaîne respiratoire. Ce n'est pas tout. Il existe une deuxième paire, DsbD/DsbC (et DsbG), non représentée ici, qui effectue l'opération inverse, c'est-à-dire de réduire à nouveau les ponts disulfures des les protéines périplasmiques. Pourquoi ? C'est probablement un système de réparation. Quand une protéine se replie, un pont disulfure erroné peut se former entre deux thiols non prévus. Un va-et-vient entre oxydation et réduction peut s'opérer jusqu'à l'acquisition de la solution correcte, un effet apparenté à celui des chaperons moléculaires.

Les échanges d'électrons nécessaires se font avec la membrane cytoplasmique. Les deux cascades antagonistes font et défont des ponts disulfures dans les protéines. Les métallothionéines pourraient donc capter et se débarrasser alternativement de leur charge métallique par des oxydoréductions similaires commandées en fonction des conditions.

L'**aluminium** est rarement cité en biologie malgré son abondance dans l'écorce terrestre où il est massivement immobilisé dans des silicates. Les propriétés chimiques des ions aluminium ont des analogies avec celles de cations divalents comme Mg^{2+}et Ca^{2+}, ou trivalents comme Fe^{3+} et Cr^{3+}. L'aluminium entre en compétition avec le magnésium et le calcium pour les atomes d'oxygène. Par contre les ions Al^{3+} ont des effets toxiques sur les cellules. Il y a depuis quelque temps un regain d'intérêt pour l'aluminium qu'on soupçonne d'être en partie responsable de troubles neurologiques comme la maladie d'Alzheimer. Heureusement presque tout

---

2 - La réaction est celle des nucléoside-diphosphate réductases, avec la thiorédoxine réduite comme donneur. La thiorédoxine oxydée est réduite à nouveau par NADPH à l'aide d'une thiorédoxine réductase .

l'aluminium de l'environnement est sous forme insoluble et son influence biologique en est limitée. Cependant les ions AlF_4^- formés en présence de fluorure ont une action toxique au niveau des régulations cellulaires, et inhibent le fonctionnement des GTPases, car ils imitent les ions phosphate. Le tandem formé par Al^{3+} et le GDP dans le site enzymatique se comporte comme un analogue du GTP. L'aluminium ne fait alors qu'aggraver les effets désastreux exercés sur la flore par les pollutions au fluor [3].

À taux égal, l'impact des différents métaux sur l'environnement dépend de facteurs multiples rangés sous le terme de **spéciation [16]**. Elle dépend :

- de la nature du métal ;
- de son degré d'oxydation ;
- de son état physique (solide, liquide, colloïdal, cristallin, adsorption sur une surface…) ;
- de sa structure moléculaire détaillée.

Par exemple le chrome sous forme d'oxyde de Cr(VI) se présente comme un anion tétraédrique soluble facilement entraîné par les eaux, alors que le Cr(III) est entouré par 6 atomes d'oxygène dans un complexe octaédrique, insoluble et immobile, ce qui le rend beaucoup moins dangereux pour les organismes. De façon générale, l'adsorption des polluants métalliques sur des surfaces organiques, les argiles et autres silicates interfère avec leur mobilité et leur accessibilité biologique.

14.4 - MÉTAUX ET POLLUTION

Grâce à l'analyse des glaces du Groenland et de l'Antarctique, nous disposons d'archives remarquables de la pollution métallique engendrée par l'activité humaine. La contamination s'effectue au niveau de la troposphère par les poussières portées par les vents, selon des courants aériens bien connus des météorologues. Le vent du sud amène de très fines poussières qui se remarquent aisément sur les voitures ou les toitures vitrées, jusqu'à teinter la neige des Alpes en ocre ou en rose. Ces poussières viennent généralement de plusieurs régions du Sahara, où elles sont entraînées par des vents violents. Un trajet classique est celui de poussières soulevées en Mauritanie par les alizés, portées à haute altitude au-dessus de l'Atlantique et rejetées vers le Nord-Est en direction de l'Europe par les contre-alizés (*jet-streams*). Encore s'agit-il de poussières "propres", essentiellement silicatées. Les rejets de poussières métallifères dans la basse atmosphère émanent surtout de l'industrie et des transports, et colportent du plomb, du zinc, du cadmium, du cuivre…

D'après les premières mesures faites en 1969, la contamination de la glace du Groenland par le plomb aurait augmenté 200 fois depuis le début du siècle. Cette contamination a été attribuée aux additifs tels que le plomb tétraéthyle qui a été utilisé comme antidétonant dans l'essence. De nombreux pays décidèrent d'en

---

3 - Exemple dans le passé : la pollution causée par les industries chimiques de la vallée de la Maurienne.

limiter l'utilisation dès 1970, avant de les interdire complètement. Des carottages ont été pratiqués dans le Groenland central au nord du 72e parallèle, par des technologies "ultra-propres" susceptibles d'éliminer toute contamination artefactuelle de la glace au cours de son extraction, car les doses de métal analysées sont de l'ordre du picogramme par gramme d'eau. Pour le cadmium, cela équivaut à trouver un gramme de ce métal dans 20 millions de tonnes de glace **[17]** ! Les échantillons manipulés avec de grandes précautions ont été transportés congelés en Australie pour être examinés par des spectroscopies ultrasensibles (K. ROSMAN, Université de Perth). Naturellement, plus on creuse profond, plus on remonte dans le temps, et plus les mesures sont délicates. Des expériences du même type ont été faites dans plusieurs parties du monde. L'examen de la neige tombée en 1998-99 dans les Alpes françaises a mis en évidence une pollution par le plomb venant de l'activité humaine, l'analyse isotopique suggérant un apport en provenance de l'Europe de l'Est **[18]**.

La métallurgie du plomb serait vieille de 6000 ans. Le plomb était extrait de la galène, qui est un sulfure renfermant un peu d'argent. Le grillage du minerai produisait des oxydes, qui était fondu plusieurs fois à l'air libre ce qui avait pour effet d'enlever l'oxyde d'argent. La réduction en métal fondu se faisait par du charbon de bois. Une activité très polluante ! On estime qu'à l'apogée de l'Empire romain, la production globale a pu atteindre 80 000 tonnes par an, dont 4-5% se retrouvaient dans l'atmosphère [4] ! L'analyse de la glace a révélé l'importance de cette pollution, qui s'est élevée à 5 fois le niveau naturel avant de décroître au cours de la décadence de l'Empire, puis de s'élever à nouveau après le Moyen Âge. La pollution globale par le plomb entre 1850 et 1915 aurait été multipliée par cinq. On a tenté de l'expliquer par la circulation maritime, car les baleiniers et navires marchands brûlaient du charbon contenant du plomb. Une stabilisation et même une diminution ont été constatées à partir de 1915 lors de l'ouverture du canal de Panama qui évitait aux navires de contourner le Cap Horn. Une forte remontée s'est produite après 1940 avec l'énorme accroissement de la circulation automobile, laissant loin derrière elle la pollution engendrée par nos ancêtres ! L'analyse des isotopes du plomb a permis de se faire une idée de l'origine géographique du métal **[19]**. Une part très importante était prise par l'Amérique du Nord. Après 1972 a été observée une chute marquée de l'apport de plomb accompagnant les mesures sévères prises pour bannir le plomb de l'essence. On sait que le passage à l'essence sans plomb est devenu obligatoire en France le 1er Janvier 2000. Comme quoi il n'est pas vain pour les gouvernements de prendre des mesures de protection efficaces.

Une histoire comparable existe pour d'autres métaux comme le **cuivre**. Ce métal fut d'abord exploité à l'état natif, puis à partir de minerais (oxydes et carbonates) à

---

4 - Dans les années cinquante, le plomb des cités antiques était encore recherché pour la confection des enveloppes de détecteurs GEIGER à bas bruit de fond. Un tel pillage des richesses archéologiques étant maintenant proscrit, on prépare le plomb ultrapur par raffinage du plomb "moderne". Le plomb a quatre isotopes naturels stables, dont trois sont engendrés par la décomposition radioactive de l'uranium et du thorium.

partir de l'Âge du bronze. L'analyse de la glace a permis de détecter deux surcroîts de pollution au cours de l'histoire, supposés liés à l'ère romaine et à l'industrie chinoise de la fin du premier millénaire [5]. Le fort tonnage de cuivre extrait des mines au cours des temps modernes n'a pas entraîné une augmentation aussi grande que ce que l'on pouvait craindre, grâce aux progrès technologiques réalisés dans la cuisson et le raffinage des minerais.

Une autre pollution de l'ère industrielle est celle du **cadmium**. C'est un sous-produit du traitement des minerais de cuivre, de plomb et surtout du zinc. Il est utilisé en galvanoplastie, dans la confection de batteries Ni-Cd et autres, dans la fabrication de pigments, de réactifs chimiques et dans la production des matières plastiques. Des métaux toxiques comme le cadmium et le vanadium peuvent s'accumuler dans les sols et passer dans les plantes cultivées. Les engrais chimiques phosphatés en contiennent comme impuretés. Le cadmium est considéré comme cancérigène. Les pays riches ne sont pas seuls à répandre des métaux dans la nature. Des problèmes apparaissent un peu partout dans le monde à cause de pratiques minières artisanales dans l'extraction de l'or ou d'autres métaux. La contamination de l'environnement par l'**étain** s'étend à cause de l'utilisation massive des boîtes de conserve et emballages métalliques des boissons. L'emploi de l'étain à ces usages est un marché de plus de 50 000 tonnes par an et représente un fort enjeu économique. Plutôt que de bannir l'étain, on envisage une meilleure récupération du métal lors du tri des déchets.

Les micro-organismes du sol et des eaux sont donc conduits à résister à la menace que constitue l'entrée d'un excès de métal dans leur cytoplasme. C'est autour des sites miniers et industriels qu'on peut récolter assez facilement des micro-organismes résistants. Les bactéries ont développé plusieurs stratégies pour lutter contre un empoisonnement métallique :
- le pompage du métal vers l'extérieur de la cellule ;
- une oxydoréduction susceptible de rendre les cations moins solubles en facilitant leur précipitation autour de la cellule ;
- l'insertion dans des complexes comme ceux de la métallothionéine déjà citée.

D'autres stratégies sont également possibles. Les propriétés de résistance accompagnent généralement l'acquisition de gènes supplémentaires codant pour de nouvelles protéines. Les micro-organismes utilisent souvent en même temps plusieurs systèmes de défense qui sont pratiquement toujours régulés par induction et répression. En outre les cellules améliorent leur capacité de résistance en exacerbant les mécanismes de réparation en rapport avec un état de stress.

D'où viennent les gènes de résistance ? Ils sont généralement apportés par des **plasmides**. Aucun d'eux ne confère d'un seul coup une résistance à tous les métaux. Par contre un même plasmide peut commander des résistances multiples et donner lieu à des situations remarquables. Un *Ralstonia metallidurans*-34 est

---

5 - *S. HONG & coll. (1996) Science* **272** *: 246-249. Les besoins en cuivre étaient irréguliers mais importants dans l'antiquité, en particulier pour la frappe des monnaies. Forte inflation, conquêtes et changement de régime politique ont dû augmenter la consommation. C'est sans doute grâce à cela qu'on trouve dans les sites archéologiques autant de pièces perdues, oubliées, ou encore jetées quand elles n'avaient plus aucune valeur.*

issu de terrains contaminés par divers métaux à des teneurs s'élevant à 50 000 ppm. Les systèmes de défense basés sur plasmide concernent notamment l'argent, le chrome, le cuivre, le mercure, le nickel, le titane et le zinc. Existent aussi des mécanismes de défense contre l'arsénite, l'arséniate et le chromate. Les gènes concernés sont ordinairement regroupés en opérons. Chaque système de défense est plus ou moins spécialisé contre une cible déterminée **[20]**. Or la spécificité d'un transporteur est rarement stricte. En expulsant un métal indésirable, la cellule peut évacuer par mégarde un autre élément dont elle a besoin et dont elle risque de se trouver carencée. Il y a donc des parades, et on peut s'expliquer ainsi que les mécanismes de transport sont généralement contrôlés par des réglages perfectionnés. Le tableau suivant montre quelques exemples de plasmides examinés dans la littérature **[21]** :

Plasmide	Hôte	Résistance	Gènes	Mécanisme*
R773	*E. coli*	As(III), As(V), Sb^{3+}	*arsABC*	A
p1258	*Staphylococcus aureus*	Cd^{2+}, Zn^{2+}	*cadA*	A
R100	Espèces variées	Hg^{2+}	*merR*,OP,TPAD	R
pDU1358	*Serratia*	Hg^{2+}, méthyl-Hg	*merR*,OP,TPABD	R + L
pMOL28	*Ralstonia metallidurans* 34	Co^{2+}, Ni^{2+}, CrO_4^{2-}	*cnr*, *chrABC*	E, E+I
pMOL30	*Ralstonia metallidurans* 34	Cd^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}	*czcCBAD*	E
pUM505	*Pseudomonas aeruginosa*	CrO_4^{2-}	*chr*	I
pRJ1004	*E. coli*	Cu^{2+}	*cdr*, *pcoARBC*	E + rep

La lettre A dans la colonne de droite (*) désigne l'expulsion des éléments indésirables sans oxydoréduction. Comme elle a lieu à contre-courant thermodynamique, une dépense d'énergie est nécessaire. La source d'énergie est l'ATP ou le potentiel membranaire. Dans le premier cas, la pompe est une ATPase spéciale. Dans l'autre il s'agit d'un système antiporteur : les protons poussés vers l'intérieur par le potentiel croisent le métal qui se dirige vers la sortie. L'intervention d'une oxydoréduction est signalée par R. La résistance au mercure implique typiquement une réductase et une lyase organomercurique (L). Une résistance par efflux (E) et une barrière à l'entrée du métal (I) interviennent aussi. Enfin les mécanismes de résistance peuvent mettre en jeu des enzymes de réparation des dégâts causés à l'ADN (rep).

Les plasmides porteurs de gènes de résistance peuvent accueillir en même temps d'autres opérons impliqués dans des biodégradations de xénobiotiques et offrent ainsi des perspectives pratiques intéressantes. D'autre part des espèces acidophiles que nous connaissons, comme des *Thiobacillus*, résistent à de très fortes concentrations métalliques et sont utilisées dans la lixiviation de minerais à faible teneur de fer et de cuivre. L'espoir des chercheurs et techniciens chargés de décontaminer les sols est de favoriser la croissance de tels germes en ajoutant des nutriments et des facteurs de croissance, afin d'obtenir un lixiviat à partir duquel on peut précipiter les métaux lourds, les récupérer ou les éliminer.

14.5 - Le pompage du cadmium et du zinc

Ces deux éléments métalliques nous offrent des exemples de protection par pompage à travers la membrane. Le cadmium ne fait pas partie des éléments indispensables à la vie, contrairement à l'autre, et son abondance dans la lithosphère est relativement faible (0,15 g par tonne). Mais l'accumulation de ces métaux pose rapidement des problèmes environnementaux. Les contaminations proviennent de déchets industriels ou ménagers (batteries, galvanoplastie, alliages, pigments). La fabrication des piles et accumulateurs représente à elle seule près de 40% du cadmium consommé. En général les ions ne pénètrent pas librement dans une cellule sans le concours d'un transporteur. Les ions Cd^{2+} n'échappent pas à cette règle, mais profitent fortuitement du système prévu pour le manganèse, et parviennent ainsi au cytoplasme. Un premier exemple de défense fondé sur le pompage du **cadmium** vers l'extérieur a été examiné en détail chez *Staphylococcus aureus*. Diverses espèces Gram-positives ont un dispositif très similaire **[22]**.

Le refoulement de l'ion Cd^{2+} à l'extérieur de la cellule nécessite de l'ATP comme source d'énergie. Il est catalysé par une ATPase membranaire selon ce principe :

- en présence des ions cadmium l'enzyme s'autophosphoryle en un site défini par l'ATP ;
- la déphosphorylation est couplée avec le transport unidirectionnel de l'ion Cd^{2+}.

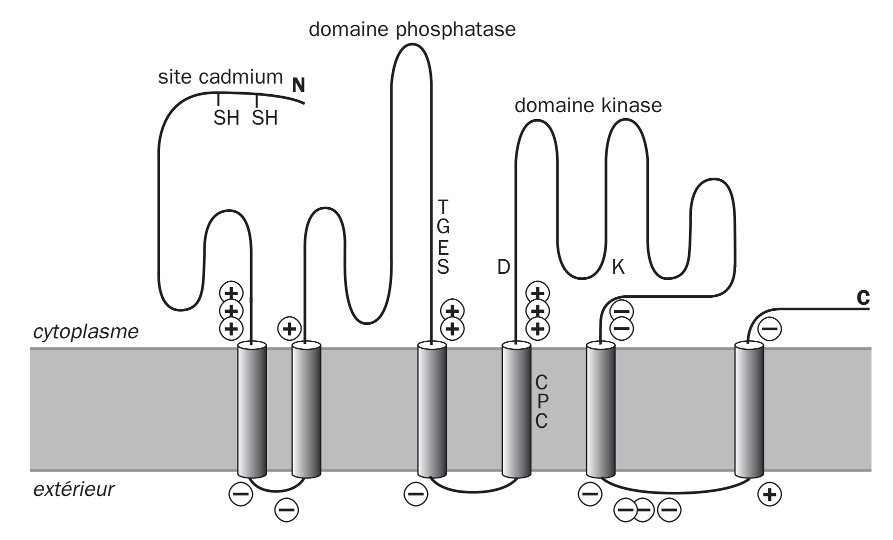
Ce principe est caractéristique des ATPases fonctionnant avec un stade phosphorylé intermédiaire et elles sont appelées ATPases de type P. Leur inhibiteur caractéristique est l'ion vanadate. L'ATPase du cadmium fait partie d'une famille regroupant des transporteurs de cations tels que ceux du calcium, du magnésium ou des métaux lourds **[23]**. La résistance de *Staphylococcus* au cadmium est codée sur un **plasmide** (pI258) porteur de l'opéron *cadAC* dont le gène de l'ATPase (**CadA**) est la pièce maîtresse. L'opéron est induit par les cations divalents agissant sur la protéine régulatrice **CadC**. Ainsi chez *Bacillus subtilis* sont inducteurs les ions Cd^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+} et Bi^{3+}, le premier étant le plus efficace. La pompe CadA est enchassée dans la membrane mais dépasse largement dans le cytoplasme où se font la fixation du cadmium, l'hydrolyse de l'ATP avec phosphorylation d'un aspartate (D) sur la protéine, l'hydrolyse de cette liaison et la translocation du métal à travers la membrane.

Un diagramme symbolise la séquence des 727 acides aminés de l'enzyme chez le staphylocoque (sans respect de l'échelle). Cette séquence laisse prévoir qu'au moins 6 hélices traversent la membrane, bordées par des charges positives et négatives contribuant à déterminer l'orientation. Le modèle structural est typique des ATPases dites de type P qui sont exportatrices de cations, mais la partie N-terminale de la séquence renferme un motif supplémentaire à deux thiols (Cys-23, Cys-26) qui existe aussi dans des protéines fixant le cuivre et le mercure. Sa fonction est de lier le métal **[24]**. Un motif de séquence caractéristique des ATPases de ce type est CPC (Cys-Pro-Cys) dans la quatrième hélice transmembranaire [6]. On le

---

6 - *La présence de proline dans une hélice alpha implique une torsion qui correspond certainement ici à une exigence structurale.*

considère comme essentiel au transport des cations. D'autres détails sont conservés dans cette famille de protéines, comme le segment de 8 acides aminés contenant thréonine, glycine, glutamate et sérine (TGES), une position aspartate-415 (D) et la lysine-489 (K) [25]. La phosphorylation transitoire se fait sur cet **aspartate** comme dans tous les transporteurs de type P des bactéries, végétaux et animaux.



Organisation de CadA

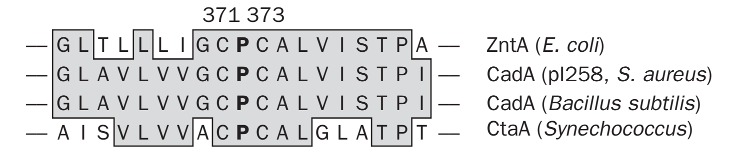
Chose curieuse, des gènes codant pour des ATPases très ressemblantes à CadA par leur séquence et leur mécanisme ont été identifiés chez l'homme, et concernent le transport du **cuivre**. Le syndrome de Menkes est une carence aigüe en cuivre causée par une ATPase du GOLGI. Le cuivre déclenche la migration de l'enzyme vers la membrane plasmique où se fait le pompage des ions. À l'inverse la maladie de WILSON est une surcharge en cuivre due à l'incapacité du foie à exporter le cuivre vers le sang ou la bile, dû là encore au défaut d'une ATPase. La ressemblance de ces pompes à ions Cu^{2+} avec CadA est une bizarrerie évolutive qui n'a pas encore reçu d'explication [26]. Elles sont désignées dans la littérature respectivement par **MNK** et **WND**. Il y a une différence cependant : du côté N-terminal se trouvent 6 motifs susceptibles de lier le cuivre au lieu d'un seul, ce qui fait que la chaîne est plus longue que celle de CadA.

Les transporteurs de cations de type P forment une famille regroupant plus d'une cinquantaine d'ATPases dont un inhibiteur caractéristique est l'ion vanadate. Le modèle CadA représente une sous-famille particulière où se rencontrent les transporteurs du cuivre évoqués précédemment, ainsi qu'un transporteur du **zinc** (**ZntA**) chez le colibacille [27], les transporteurs du cuivre **CopA** et **CopB** chez *Enterococcus hirae* [7], et **CtaA** d'un *Synechococcus* (une cyanobactérie). Nous reviendrons sur le cuivre dans la section suivante. Des protéines CadA et CopA sont présentes chez

---

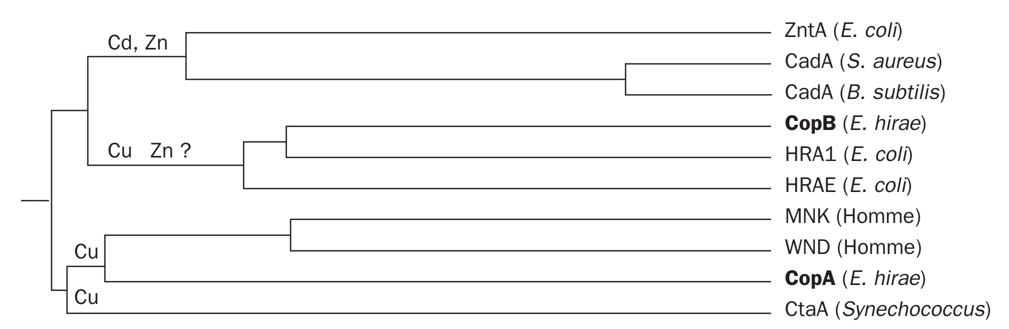
7 - Appelé antérieurement Streptococcus faecalis. Présent dans l'intestin, pathogène quand il passe dans le sang : infections rénales, endocardites...

Helicobacter pylori **[28]**. La liste est certainement bien plus longue, car la détermination complète des génomes suggère que ces enzymes sont très répandues. Le colibacille est un organisme très tolérant à des doses relativement fortes d'ions Zn^{2+}, Cd^{2+} et Pb^{2+}. Une mutation sur le gène ZntA rend les cellules très sensibles à ces métaux. L'homologie de ce transporteur avec CadA est très forte, et son fonctionnement a été étudié expérimentalement **[29]** par la technique des vésicules membranaires inversées. La liaison du métal se fait sur la séquence caractéristique Gxx*C*xx*C*z, la position z étant généralement occupée par l'alanine (A). Le site aspartate phosphorylable (D) est dans un motif F*D*KTGTLT bien conservé. Le consensus transmembranaire montré à titre d'illustration contient la proline entourée de cystéine et de résidus hydrophobes.



Homologies

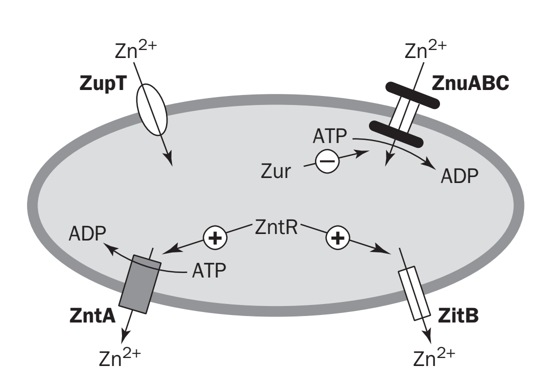
La construction d'un arbre généalogique indique une évolution de ces transporteurs vers deux voies spécialisées.



Relations évolutives basées sur les séquences

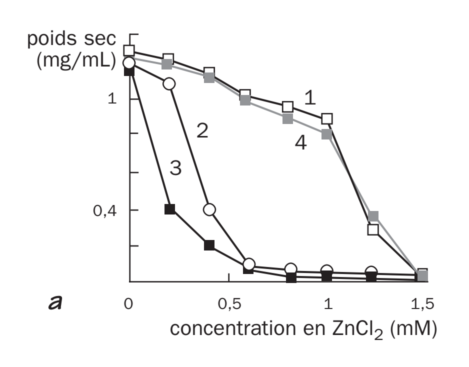
La première renferme les transporteurs du zinc et du cadmium (CadA, ZntA). La seconde est celle des transporteurs du cuivre (CatA, CopB, protéines MNK et WND de l'homme). Le génome du colibacille renferme au moins deux gènes supplémentaires correspondant à ce groupe. Ils sont présumés impliqués dans le transport du cuivre, et désignés par *HRA1* et *HRA2*. Toutes ces protéines ont un motif GCPC ou GCPH à cystéine ou histidine **[30]**. La généalogie déduite des séquences par RENSING et coll. suggère que ces ATPases ont une origine évolutive très ancienne, bien antérieure à l'ère industrielle. La présence chez l'homme de transporteurs du cuivre homologues de ceux des bactéries est là pour suggérer une ancienneté qui peut se comprendre, parce que la biosphère a été soumise de tout temps au lessivage des roches et à des émissions volcaniques. La plupart des facteurs de résistance n'interviennent qu'en cas de contamination métallique élevée. Leur localisation sur des plasmides transmissibles autorise une dissémination rapide et la survie de la population bactérienne en conditions adverses.

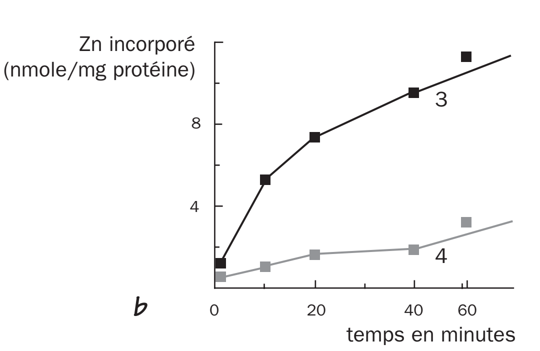
Le zinc est le métal le plus abondant dans les organismes après le magnésium. Les bactéries ont besoin de le récupérer dans le milieu et parviennent à le faire à des teneurs aussi basses que 10 nM. Inversement tout excès devient toxique. Les bactéries adaptées peuvent vivre en présence de Zn^{2+} 10 mM, soit à un taux plus élevé d'un million de fois que le précédent. Il faut donc des mécanismes régulateurs. En comptabilisant les protéines connues pour fonctionner avec du zinc, on peut estimer qu'une bactérie "standard" a besoin d'environ 2 millions d'ions Zn^{2+}, affectés pour plus du quart à l'ARN-polymérase qui en détient deux par molécule d'enzyme. Le taux interne du zinc intracellulaire est finement régulé et maintenu à un niveau de l'ordre de 1 mM. On peut provoquer artificiellement une disette en zinc par un complexant du type EDTA. Inversement un taux de $ZnCl_2$ supérieur à 1 mM déclenche un stress par excès de métal. La pompe ZntA permet au colibacille de refouler le métal à l'extérieur, tandis que deux transporteurs le font entrer : ZnuABC (de la famille des transporteurs de type ABC) et le transporteur ZupT récemment découvert. Il appartient à une famille déjà observée chez les eucaryotes **[31]**. Un quatrième facteur ZitB est un transporteur de type CDF. ZntA expulserait le zinc quand il est à taux élevé, tandis que ZitB agirait pour des taux plus faibles. Deux mutations supprimant à la fois ZntA et ZitB rendent les bactéries particulièrement sensibles à un excès de zinc, de cadmium et de plomb **[32]**. La résistance au zinc n'est donc pas réglée par un seul transporteur, mais par une remarquable palette d'outils qui interfèrent les uns avec les autres. La complexité de ces panoplies de transporteurs adaptés à des situations particulières est bien l'expression de la nécessité critique de régler finement l'entrée et la sortie d'un métal à la fois indispensable et dangereux.



Les transporteurs du zinc chez Escherichia coli

Les graphiques ***a*** et ***b*** sont tirés des expériences de GRASS, FAN et coll. (2000) pour mettre en évidence le transporteur ZitB.





Des mutants sur tel ou tel transporteur sont sélectionnés par insertion dans les gènes correspondants d'une cassette porteuse d'un marqueur de résistance à un antibiotique (tétracycline).

En *a*, la croissance de différentes souches au bout de 15 heures à 37° a été mesurée en fonction du taux de zinc dans le milieu. Les 4 séries de points expérimentaux sont les suivantes :

1 - Croissance du colibacille W3110 en présence de différentes teneurs en chlorure de zinc après 15 heures à 37°C. La toxicité du zinc devient donc importante audessus de 1 mM.

2 - Le gène de la pompe ZntA a été inactivé. Les bactéries sont plus fragiles à un excès de zinc.

3 - Les bactéries ont perdu à la fois ZntA et ZitB. La sensibilité au zinc est encore plus forte.

4 - Les bactéries utilisées pour la courbe **3** ont reçu un plasmide porteur du gène de ZitB. Ce dernier suffit à restaurer une résistance pratiquement normale lorsque ZitB est exprimé à son niveau maximum en présence d'une tétracycline. Cette précaution est indispensable, sinon le gène plasmidique serait mal exprimé et les bactéries risqueraient d'être dépourvues de ZitB dans leur membrane. L'expulsion du zinc par ZitB compense nettement l'absence de la pompe ZntA.

En *b*, les bactéries ont été mises en présence de 5 µM de sulfate de zinc marqué par le zinc-65. La pénétration du métal est suivie au cours du temps. La suspension cellulaire est rapidement filtrée sur membrane dont la radioactivité est mesurée après lavage. La courbe **3** correspond aux cellules les plus sensibles qui sont dépourvues de ZntA et ZitB. Les bactéries accumulent progressivement du métal. En **4**, il s'agit du même mutant ayant reçu le plasmide porteur du gène de ZitB. Quand ZitB est pleinement induit, l'accumulation du zinc est visiblement plus lente et s'explique par l'expulsion du zinc sous l'effet de ZitB.

Il existe une première protéine régulatrice **Zur** (*zinc uptake regulator*) homologue de Fur pour le fer (section 2). Elle lie le zinc selon une géométrie tétraédrique avec une incroyable affinité, à des doses de l'ordre de 10^{-12}M, et réprime le transporteur ZnuABC. Elle a pour effet de freiner l'entrée du zinc quand le taux de métal dans la cellule est suffisant pour les besoins. Une deuxième protéine régulatrice, **ZntR**, est homologue d'une protéine qui accélère la sortie du mercure (MerR). En activant la transcription du gène de ZntA, elle encourage le rejet du zinc quand son taux est excessif. Le réglage de la concentration interne en métal, ou homéostase, obéit donc à un réglage fin où les mêmes outils contrôlent l'entrée du zinc nécessaire à la survie et déclenchent sa sortie en cas de concentration trop élevée. Ils permettent à la cellule de se défendre contre les conditions adverses de concentration, dans un sens comme dans l'autre.

Cette section nous a donc permis de rencontrer des pompes membranaires fonctionnant comme des ATPases de type P. Ces enzymes dont le prototype est CadA permettent de refouler le métal à l'extérieur en dépensant de l'énergie ATP, son intervention étant déclenchée en présence de cadmium par CadC. Nous avons également constaté que le taux interne d'un métal essentiel à la vie cellulaire comme le zinc, était régulé par un ensemble de protéines et de régulateurs. Le

refoulement du zinc vers l'extérieur est catalysé par ZntA et ZitB, l'entrée du métal est assurée par ZnuABC et ZupT. Le fonctionnement de ce système est supervisé par deux protéines régulatrices au moins, Zur et ZntR.

14.6 - LE CONTRÔLE DU PLOMB

Retour au plomb. Plusieurs espèces bactériennes rendues résistantes au plomb ont été isolées à partir de terrains contaminés, observation devenue banale alors que les mécanismes biochimiques n'ont été étudiés que dans quelques cas. Le site minier de Carnoulès, dans le Gard, abandonné depuis 30 ans, a de vastes carrières où le minerai de sulfure de plomb était exploité. Il s'y trouve un stock important de rejets de traitement contenant encore 10% de sulfure de fer, du plomb et de l'arsenic. Les eaux d'un ruisseau avoisinant sont particulièrement acides (pH 2,5-3,5) et riches en métaux (Fe, Zn, Pb). Il en a résulté une pollution en aval par du fer et de l'arsenic. L'action des bactéries fixées en tapis stratifiés (*Thiobacillus*, *Leptothrix*), oxyde l'arsenic en arséniate (Section 10), mais il y a aussi du plomb qui coprécipite avec l'arséniate, ce qui contribue à l'immobiliser et à diminuer sa diffusion à distance **[33]**.

Le rejet du plomb par les ATPases de type P, CadA de *S. aureus* et ZntA de *E. coli*, montre que les ions Pb^{2+} sont substrats de mécanismes de résistance prévus en même temps pour d'autres cations. Par exemple le régulateur CadC, qui régule l'opéron *cadCA*, répond au plomb, au cadmium et au zinc **[34]**. Une souche remarquable est *Ralstonia metallidurans* 34 [8], isolée en Belgique il y a plus d'une dizaine d'années par MERGEAY, et renfermant deux mégaplasmides, pMOL28 et pMOL30. Ces derniers confèrent une résistance élevée à une série de métaux **[35]**. Un système autonome de résistance au plomb a été caractérisé sur le pMOL30 **[36]**, constitué par un opéron inductible, *pbrABCD* codant pour les quatre composants :

PbrA	ATPase de type P homologue de CadA et ZntA
PbrB	Lipoprotéine de la membrane externe
PbrC	Protéine membranaire qui aurait rôle dans l'exportation de PbrB
PbrD	Protéine cytoplasmique capable de séquestrer les ions Pb^{2+}.

Les homologies de séquence ont permis d'identifier les différentes pièces. Par exemple **PbrA** a des ressemblances nettes avec CadA et ZntA et sert visiblement à repousser le plomb vers l'extérieur. Le petit alignement de séquences montre le site de fixation du métal sur les trois protéines, CPTE pour PbrA, CxxC pour les deux autres.

	↓ ↓↓
PbrA de *R. metallidurans*	– I E N M D **C** P T E E A L I R D K L A K L P G V –
ZntA de *E. coli*	– V S G F D **C** A A **C** A R K V E N A V R Q L A G V –
CadA de *S. aureus*	– V Q G F T **C** A N **C** A G K F E K N V K K I P G V –

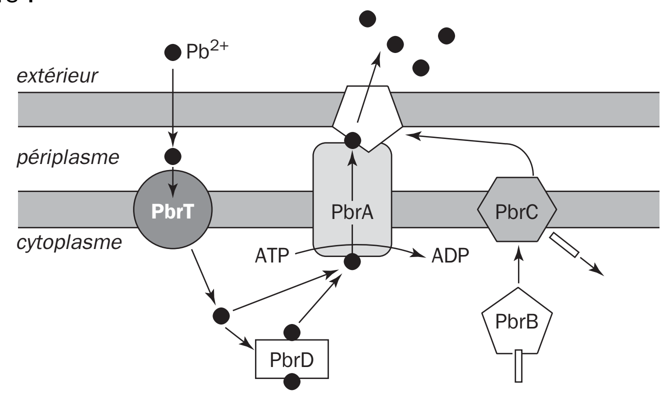
---

8 - *Anciennement Alcaligenes eutropha H34, puis Ralstonia eutropha H34.*

Ressemblance ne veut pas dire identité. Mais la présence à distance fixe de GV (les deux flèches) est l'indice d'une homologie structurale.

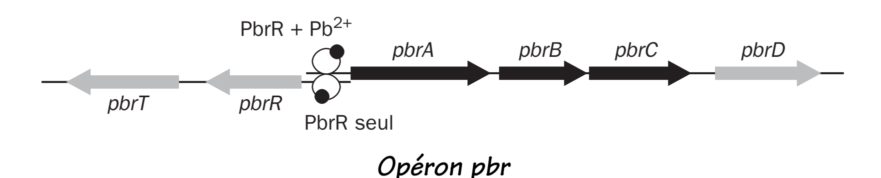
Il est très probable que PbrA fonctionne comme une ATPase insérée dans la membrane. La fonction de **PbrB** est par contre moins claire. Ce serait une lipoprotéine exportée vers l'extérieur avec l'aide de PbrC. Les trois protéines PbrA, PbrB et PbrC sont induites ensemble, et le défaut d'une seule d'entre elles rend les bactéries plus sensibles aux ions Pb^{2+}. Sur un plan général, les protéines destinées à être exportées hors du cytosol sont munies d'une portion de séquence N-terminale dite *signal**. Cette séquence est détachée la plupart du temps par une peptidase quand la protéine se trouve libérée de l'autre côté de la membrane. La protéine PbrC codée par le plasmide pMOL30 serait une telle peptidase spécifiquement affectée à l'exportation de PbrB. La quatrième protéine, PbrD, offre aussi une situation intéressante. Elle n'est pas absolument nécessaire à la résistance au plomb, mais les mutants qui en sont dépourvus accumulent moins de métal que le type sauvage. La protéine possède un motif très curieux, $C(x)_7CC(x)_7C(x)_7H(x)_{14}C$, où l'abondance de la cystéine, de la proline et de la sérine, évoque la fixation d'un métal et rappelle les métallothionéines. Son rôle serait de stocker le plomb et de le neutraliser.

Un intervenant intéressant est le facteur **PbrT**, non codé par le même opéron que l'ATPase et logé dans la membrane cytoplasmique. Cette protéine est considérée comme un transporteur de Pb^{2+} vers l'intérieur de la cellule. Quand PbrT est présent alors qu'un défaut affecte l'opéron *pbrABCD*, les cellules deviennent extrêmement sensibles au plomb, sans doute parce que celui-ci s'accumule en excès sans pouvoir être exporté. On peut se demander l'intérêt physiologique pour la cellule de posséder un tel transporteur qui en somme fait entrer l'ennemi. Deux explications sont possibles. La première est de supposer que PbrT n'est pas réellement spécifique du plomb et fait entrer un métal utile qui n'a pas été identifié. Cette idée est contredite par le fait que le transporteur est induit en même temps que l'opéron *pbrABCD*, grâce à une protéine régulatrice qui est **PbrR**. La deuxième explication laisse penser que le transporteur est là pour éloigner précipitamment le plomb du périplasme et de la membrane interne (où il y a la précieuse machinerie des oxydations), et de l'expédier sur PbrD avant d'être exporté de nouveau. Le schéma d'interprétation de Borremans et coll. (2001) résume l'intervention présumée de ces différents facteurs :



Le modèle du système pbr

Le système *pbr* est régulé par la protéine PbrR. Celle-ci commande l'opéron *pbrABCD* et son propre gène, suivi de *pbrT*. La protéine PbrR a des similitudes avec MerR qui commande la résistance au mercure (section 9).



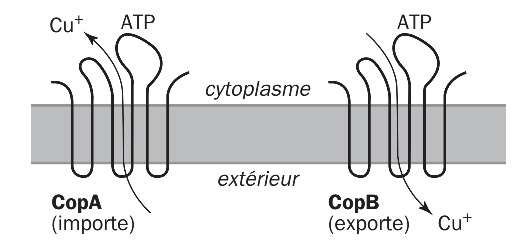
Opéron pbr

On notera la disposition caractéristique des deux transcriptions divergentes à partir du même segment d'ADN, d'un côté en présence de plomb, de l'autre en son absence.

14.7 - La résistance au cuivre

Bien qu'indispensable aux êtres vivants, le cuivre devient vite redoutable par sa toxicité quand sa teneur s'élève dans les cellules. Le cuivre est assez généreusement répandu dans la nature par l'industrie ou l'agriculture, par exemple par l'emploi de la fameuse bouillie bordelaise comme fongicide. Les mécanismes de résistance mis en œuvre sont souvent complexes et diffèrent d'un organisme à l'autre. Nous en citerons quelques-uns en commençant par *Enterococcus hira* et en terminant par *Escherichia coli*.

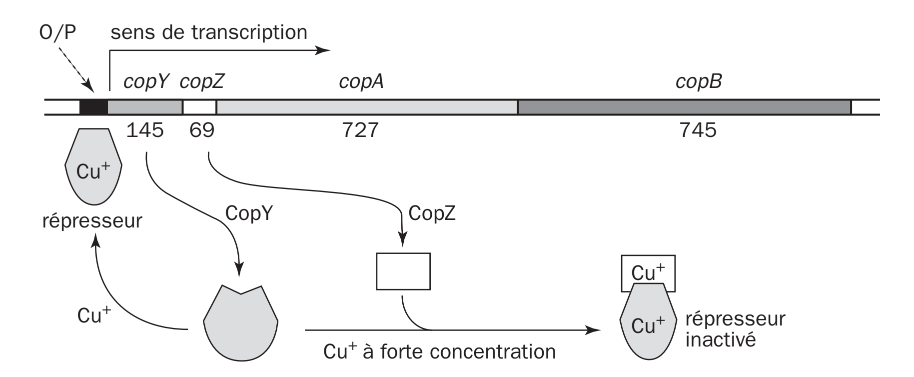
Enterococcus hirae est un pathogène dans certaines infections hospitalières. Il a des ATPases de type P spécialisées dans le transport du cuivre, qui sont **CopA** (3.A.3.5.1) et **CopB** (3.A.3.5.2), codées par des gènes chromosomiques, et longues respectivement de 727 et 745 acides aminés. Elles offrent une situation intéressante. Les mutants *copA*$^-$ deviennent relativement résistants au cuivre et ont besoin d'un taux supérieur de ce métal dans leur milieu pour croître. La protéine CopA serait donc impliquée dans le transport du cuivre(I) de l'extérieur vers l'intérieur **[37]**, contrairement à la CopA de *E. coli* (3.A.3.5.1) qui travaillerait dans l'autre sens. La protéine comporte deux sites dithiols, C-x-x-C et CPC, et le transport se ferait essentiellement sur le second. Le deuxième facteur CopB travaillerait de l'intérieur vers l'extérieur. Il a été possible d'observer ces transports avec des vésicules isolées comme dans l'expérience faite avec CadA : l'accumulation de cuivre-64 s'obtenait en présence d'ATP et de conditions réductrices. Les deux transporteurs sont des ATPases de type P et ont ici des effets antagonistes. Elles fonctionnent aussi avec Ag^+, ont besoin d'un réducteur dans des membranes isolées, et le véritable substrat du transport dans les deux cas semble bien être du cuivre réduit (Cu^+). Une oxydoréduction fonctionnerait donc à la périphérie cellulaire en parallèle avec le transport.



Les deux pompes de structure comparable mais non identique ont la même orientation car elles captent l'ATP du côté interne. Si elles fonctionnent dans des directions opposées, cela pose une énigme intéressante. Un transporteur subit des changements de conformation au cours d'un cycle catalytique comme n'importe quelle enzyme. Un transport s'effectuant sans couplage avec une dépense d'énergie peut s'effectuer potentiellement dans les deux sens, avec un va-et-vient réversible entre deux états X et Y. C'est ce qu'on appelle une diffusion facilitée, avec passage prédominant du compartiment le plus concentré vers le moins concentré. Au contraire si un couplage a lieu comme ici avec une hydrolyse d'ATP, le passage de l'entité transportée (le cuivre) ne suit pas exactement le même cheminement de X vers Y et de Y vers X. Il s'établit un circuit analogue à un cycle d'hystérésis entre les deux parcours qui ne sont pas strictement inverses l'un par rapport à l'autre. Dans CopA, une moitié du cycle est favorable au passage du cuivre de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, dans CopB c'est l'autre partie du cycle qui interviendrait en poussant le cuivre dans l'autre sens. La protéine CopB serait une pompe expulsant le trop-plein de cuivre sous forme de Cu^+. Elle est active aussi sur l'argent (Ag^+) **[38]**.

On peut essayer de comprendre provisoirement cette situation assez paradoxale, en attendant que le mécanisme exact du transit soit mieux connu. Les deux gènes *copA* et *copB* appartiennent au même opéron, ainsi que deux autres gènes *copY* et *copZ*, qui codent pour des protéines régulatrices capables de lier le cuivre ou l'argent. Le dispositif est apparemment réglé pour que la cellule dispose en permanence du cuivre (n'oublions pas son caractère indispensable), mais qui veille à ce qu'il n'y en ait pas trop. Voici le schéma de cet opéron avec son système de régulation **[39]**.

L'opéron *copYZAB* est transcrit d'une seule pièce en aval du promoteur (O) tant que la protéine CopY, un répresseur, ne vient pas s'installer sur la région O/P (opérateur/promoteur). C'est le cas lorsque le milieu est pauvre en cuivre. La protéine CopY est alors libre dans le cytoplasme. Les ions prélevés à l'extérieur et réduits en Cu^+ sont importés par la pompe CopA qui est synthétisée puisque l'opéron est transcrit. La pompe CopB sert de soupape et empêche le taux intracellulaire du cuivre de monter. Or il reste modéré parce que le métal est utilisé au fur et à mesure pour la croissance.



Quand le taux de métal augmente, des ions Cu^+ (ou peut-être Cu^{2+}) sont captés par CopY qui devient un répresseur actif, s'attache à l'ADN en O/P et freine la transcription de l'opéron. La cellule n'a plus besoin momentanément des pompes CopA et CopB, les besoins étant assurés pourvu que la concentration intracellulaire en cuivre reste dans des limites tolérables.Un mutant privé d'un gène *copY* fonctionnel exprime intensément l'opéron et notamment *copB*, permettant aux cellules de se développer en présence d'une concentration très forte en sulfate de cuivre (10 mM). Par contre ce même mutant croît beaucoup plus lentement que la souche sauvage en milieu pauvre en cuivre, sans doute parce que l'excès de CopB refoule au fur et à mesure le cuivre qui vient de l'extérieur. Le mutant récupère un comportement quasi normal si on y introduit un plasmide porteur d'un gène *copY* intact qui réalise ce qu'on appelle une complémentation.

Si le taux de métal élevé devient excessif, la protéine CopZ intervient. En liant Cu^+, elle s'attache à CopY et l'empêche de fonctionner comme répresseur. Le site O/P étant alors libre, l'opéron est exprimé et l'indispensable pompe CopB, celle qui expulse le cuivre, est fabriquée. Les bactéries peuvent alors se multiplier en présence de sulfate de cuivre 8 mM, ce qui est énorme. Les ions du cuivre agissent donc comme inducteurs dans ces conditions. Les ions Cd^{2+} et Ag^+ ont le même effet. Les protéines CopY et CopZ changent l'une et l'autre de propriétés en liant les ions Cu^+, à la suite d'une modification structurale de nature allostérique, mise en évidence en RMN dans le cas de CopZ **[40]**.

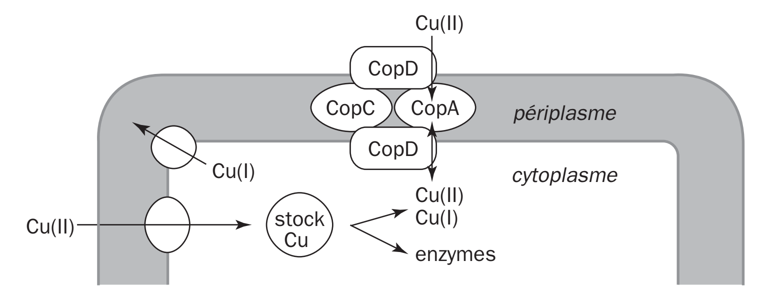
La solution observée chez *E. hirae* n'est pas extrapolable à toutes les espèces bactériennes. La nature recèle au contraire une grande variété de solutions. *Synechococcus* PCC7942 est une **cyanobactérie** détenant une ATPase membranaire pour l'entrée du cuivre (**CtaA**, dont le gène figure dans l'arbre généalogie de la section 5), et **PacS** localisée dans la membrane du thylakoïde pour la sortie. Les deux gènes *ctaA* et *pacS* ne sont pas liés et sont régulés séparément **[41]**. Une situation encore différente se rencontre chez une autre cyanobactérie, *Synechocystis* PCC8303. Ces ATPases sont certainement répandues aussi chez les eucaryotes. La levure de bière pompe les ions cuivre extérieurs avec une ATPase ressemblant à la CopA rencontrée précédemment **[42]**.

L'examen de *Pseudomonas syringae* révèle un dispositif particulier. Cette espèce renferme un groupe de pathogènes des plantes cultivées, produisant des taches et des auréoles sur les feuilles. L'emploi courant d'agents antifongiques contenant du

cuivre comme la bouillie bordelaise a facilité l'apparition d'espèces résistantes au cuivre. Une des premières études détaillées a concerné un *Ps. syringae* isolé de cultures de tomates et porteur du plasmide pPT23D **[43]**. La résistance au **cuivre** des espèces bactériennes leur est souvent conférée par un plasmide porteur de gènes qui se retrouvent sous une forme très similaire dans les *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et autres. Les gènes de structure sont dans l'opéron *copABCD* accompagné des deux gènes régulateurs *copR* et *copS*. La nomenclature est ici fort malencontreuse, car ces gènes n'ont rien à voir avec ceux de la résistance au cuivre décrits chez *E. hirae*. Les protéines Cop citées maintenant sont donc totalement différentes des précédentes.

Les quatre protéines **CopA**, **B**, **C** et **D** fabriquées grâce au plasmide viennent en renfort des facteurs déjà codés par la bactérie sur son chromosome, spécialisés dans le transport du cuivre et son stockage éventuel à l'intérieur du cytoplasme. Les gènes plasmidiques sont groupés en opéron *copABCD*. La protéine CopD est membranaire, CopA et CopC sont périplasmiques, CopB serait associée à la membrane externe. Quant au tandem **CopR** + **CopS**, il intervient dans une régulation classique à deux composants : CopS s'autophosphoryle en présence du métal, et phosphoryle à son tour CopR qui est l'activateur de la transcription **[44]**. Nous savons que les systèmes à deux composants sont construits sur une base commune reconnaissable par les homologies de séquence. Ils fonctionnent en gros de la même manière en utilisant un capteur et un régulateur. Le premier détecte le problème, le second passe la commande en activant la transcription des gènes concernés.

Le schéma résume le transport du cuivre de façon hypothétique. Sont mis en jeu des facteurs membranaires de transport et de stockage codés par le chromosome (à gauche), et l'appareil de résistance Cop codé par le plasmide.



Transport du cuivre et résistance

Le robinet d'entrée du cuivre n'est jamais complètement fermé, car la cellule en a besoin comme oligo-élément. Si la concentration intracellulaire du métal devient excessive, il y a deux parades : le piéger par des protéines spécialisées, si possible au niveau du périplasme, ou l'expulser totalement. La première méthode existe, au moins en partie, chez *P. syringae*, dont les colonies deviennent d'un beau bleu en présence d'un sel de cuivre, car elles retiennent les ions Cu^{2+} dans leur périplasme. On pense généralement que les deux procédés coexistent, le cuivre accumulé dans le périplasme étant celui que les cellules n'ont pas encore eu le

temps de libérer dans le milieu. Néanmoins le piégeage périplasmique est peut-être physiologiquement avantageux comme une mise à l'écart du métal pour en limiter les effets toxiques. CopA semble efficace pour cela, car la protéine peut retenir 11 ions cuivre grâce à la répétition du motif séquentiel MxxMxHxxM et de sites histidine surnuméraires, tandis que CopC n'en auraient qu'un seul. Les protéines CopA et CopC seraient donc des protéines périplasmiques de stockage de Cu(II), mais on connaît mal leurs relations avec les deux autres partenaires membranaires. Il existe en outre une oxydoréduction des ions cuivre entre Cu(I) et Cu(II), mais on ignore presque tout de son mécanisme.

Neutraliser les ions cuivre par des protéines ? Le procédé peut paraître onéreux pour la cellule. Il n'est peut-être pas suffisant. *P. syringae* se sert éventuellement de polysaccharides externes, comme les **alginates**, pour complexer ces ions. La synthèse d'alginate dans certaines souches, qui deviennent mucoïdes, est induite assez spécifiquement par les ions cuivre. Ce n'est jamais qu'un cas particulier de ces bactéries qui utilisent les alginates comme agents protecteurs, malheureusement pour nous quand il s'agit de formes pathogènes dont le pouvoir infectieux n'en est que renforcé.

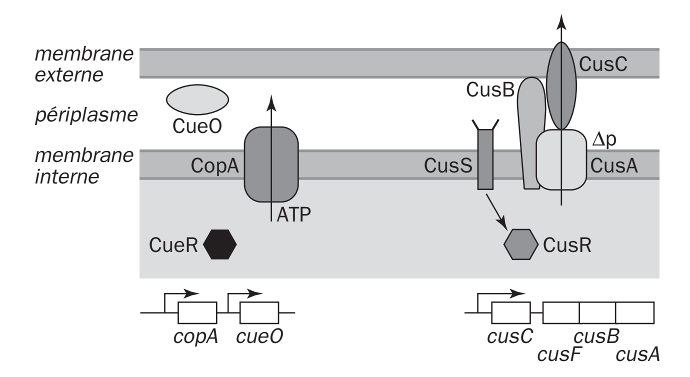
Escherichia coli héberge des gènes plasmidiques (pRJ1004) comparables à ceux de *P. syringae,* La terminologie officielle étant *pcoABCD* et *pcoRS* **[45]**. La découverte de colibacilles résistants au cuivre tire son origine de l'élevage industriel du porc : les bactéries ont été isolées à partir des déjections de jeunes animaux auxquels on administrait des rations augmentées en cuivre pour promouvoir leur croissance ! Le fait dominant est ici l'existence de deux appareils différents pour évacuer le cuivre du cytoplasme, les systèmes *cue* (*Cu efflux*) et *cus* (*Cu-sensing*). Chacun possède son propre régulateur. Le colibacille est un anaérobie facultatif, l'un des systèmes est mieux adapté à l'aérobiose, l'autre à l'anaérobiose.

Activateurs	Protéine	Nature
CueR	CopA	Dans la membrane interne, ATPase exportatrice de Cu^+.
	CueO	Oxydase contenant 4 Cu, oxyde Cu^+, Fe^{2+}, des sidérophores.
CusR, CusS	CusC	Protéine de la membrane externe. Système actionné par Δp.
	CusB	Ancrée dans la membrane interne avec long domaine périplasmique.
	CusA	Antiporteur de la famille RND, fait sortir Cu^+ et entrer un proton.
	CusF	Lie le cuivre dansle cytoplasme.

Les compétences des deux systèmes se recouvrent en grande partie **[46]**. La pompe **CopA**, induite par **CueR** quand la concentration interne en cuivre prend une valeur critique, aurait le rôle principal dans la tolérance au métal en vie aérobie. La protéine a été caractérisée comme ATPase de type P **[47]**. Inversement les protéines CusABC forment un complexe induit par CusR. Sa fonction prédominerait en anaérobiose. Le tandem **CusS/CusR** est un système à deux composants où CuS a pour fonction de détecter les ions Cu^+ dans le périplasme, et où CusR est l'activateur. Leur détection dans le cytoplasme appartient à CueR. Le métal est donc reconnu dans les deux compartiments. Le système *cus* est également activé par les ions argent (Ag^+) qu'on peut considérer comme des analogues des ions Cu^+.

Le système *cusCFBA* pour les biochimistes est un représentant de la vaste famille des ***transporteurs RND****, dont l'une des branches est consacrée au transport vers l'extérieur de cations métalliques. Ce système est tout à fait distinct des ATPases de type P car il tire son énergie du potentiel membranaire. Le quatrième constituant, CusF, est une petite protéine capable de lier le cuivre dans le périplasme. Sa fonction n'est pas encore bien cernée.

Un schéma évoque les deux systèmes **cue** et *cus*. On y voit un facteur CueO. Quel est le rôle de cette protéine ? Cette protéine est une oxydase transformant les ions Cu^{+} en Cu^{2+} au niveau du périplasme. La réduction du cuivre intervient au niveau cellulaire sous l'action du métabolisme et de plusieurs réductases et augmente en anaérobiose. Le potentiel Cu^{2+}/Cu^{+} en solution aqueuse ions est très physiologique, soit E'° = + 150 mV , peu éloigné de celui du glutathion (+ 220 mV). Or les ions Cu^{+} sont plus toxiques que la forme oxydée, car ils induisent des réactions radicalaires. Inversement Cu^{+} est plus favorable au passage à travers la membrane interne pour des raisons énergétiques. Quand la pompe CopA fonctionne, les ions Cu^{+} sont éjectés dans le périplasme où ils sont oxydés par CueO et accumulés. On peut penser que lorsque ce système est saturé, la présence des ions Cu^{+} en excès est alors détectée par CusS, qui contribue à activer l'autre système.



L'exportation du cuivre chez E. coli

La structure de l'oxydase périplasmique CueO est connue en détail par la cristallographie **[48]**. Elle renferme 4 ions cuivre dont un séparé des trois autres et de type I (voir *cuivre**). Elle se rapproche d'autres cuproprotéines comme la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine. L'enzyme n'oxyde pas que le cuivre, mais aussi les ions Fe^{2+}, le 2,6-diméthoxyphénol et le sidérophore entérobactine. La fonction précise de cette oxydase reste néanmoins incertaine.

En résumé, il est visible que l'entrée du cuivre et la lutte contre les excès du métal ont fait naître au cours de l'évolution une variété de dispositifs. *Enterococcus hirae* contrôle l'entrée et la sortie par les ATPases CopA et CopB, régulées par CopY et CopZ. La deuxième solution évoquée est celle de *Pseudomonas syringae*, avec apport plasmidique de facteurs CopA, B, C et D répartis entre la membrane externe, le périplasme et la membrane interne. Les régulations se font par un système à

deux composants, CopR et CopS. Finalement le colibacille possède au moins deux systèmes différents, celui de l'ATPase CopA régulé par CueR et favorisé en aérobiose, l'ensemble CusAFBC dominant en anaérobiose, régulé par les deux composants CusS et CusR. Une protéine CueO intervient dans une oxydoréduction sur le cuivre.

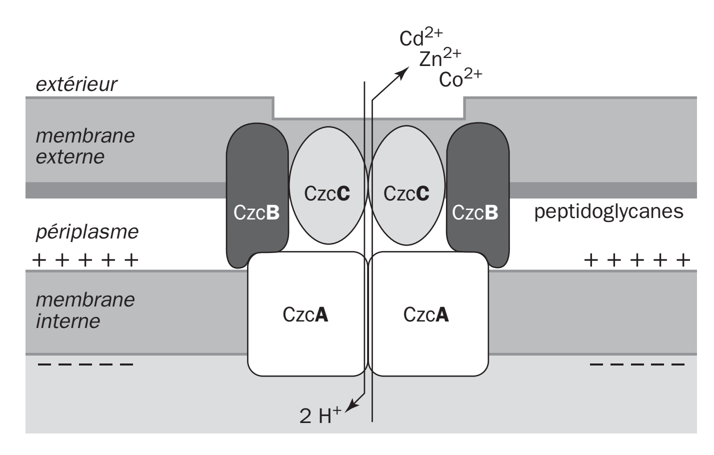
14.8 - Transport par potentiel membranaire

Nous retrouvons ici le cadmium, mais il revient accompagné du cobalt, du zinc, du chrome et du mercure. Le principe de défense est encore l'expulsion du métal hors du cytoplasme, mais l'ATP est remplacé par le potentiel de membrane comme source d'énergie. La sortie des ions métalliques est couplée avec l'entrée des protons, selon le principe des transporteurs RND évoqués dans le cas du cuivre. Leur analyse a été faite par génétique moléculaire. Le petit tableau nous aidera à retrouver la signification des sigles génétiques utilisés dans la littérature :

Sigle	*Résistances*	*Organismes*
cus	cuivre, argent	*Escherichia coli*
czc	cadmium, zinc, cobalt	*Ralstonia metallidurans*
czr	cadmium, zinc	*Pseudomonas aeruginosa*
cnr	cobalt, nickel	*Ralstonia metallidurans*
ncc	nickel, cobalt, cadmium	*Alcaligenes xylosoxidans*
sil	argent	*Salmonella*

Une première espèce bactérienne modèle est le *Ralstonia metallidurans* (déjà cité et désigné autrefois comme *Alcaligenes eutropha*), un chimiolithotrophe facultatif du sol ne se développant guère à plus de 30°C. Les bactéries peuvent utiliser l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie, et vivre en autotrophie sur CO_2, mais se cultivent commodément sur gluconate. La souche la plus intéressante est *R. metallidurans* CH34 de MERGEAY et coll. **[49]**. Les multiples facteurs de résistance présents dans cette souche sont situés sur les deux mégaplasmides, pMOL28 (180 kb) et pMOL30 (238 kb), dont l'ensemble confère une résistance très élevée à 9 métaux. L'opéron *czcCBA* sur pMOL30 code pour une résistance au **cobalt**, au **zinc** et au **cadmium** où participent trois protéines formant un complexe placé à cheval sur les deux membranes. On en connaît la composition, mais son organisation réelle reste problématique **[50]**. L'arrangement symétrique suggéré par le croquis est une interprétation hypothétique. Le fonctionnement serait celui d'un antiporteur. Quand un ion métallique sort, des protons rentrent.

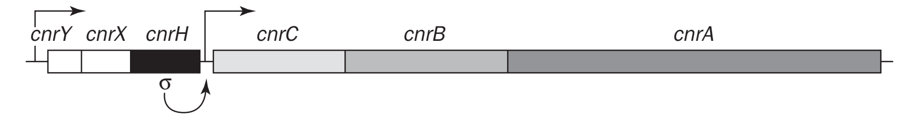
On suppose que les charges sont équilibrées (deux protons pour un cation bivalent). Le potentiel membranaire bâti sous forme d'une force protonmotrice Δp par couplage avec les oxydations cellulaires, favorise le retour des protons vers l'intérieur et entraîne l'expulsion d'un ion métallique.



Le complexe antiporteur Czc

La pièce essentielle serait **CzcA** dans la membrane interne. Les deux autres protéines, **CzcC** et **CzcB** faciliteraient le passage à travers le périplasme et la membrane externe. Le retour des protons au cytoplasme pendant la sortie des cations métalliques entraînerait donc une augmentation locale de pH et la précipitation des sels métalliques (hydroxydes, carbonates, sulfures). Il se formerait d'abord un dépôt amorphe, puis des cristaux visibles en microscopie électronique. Cette précipitation des sels métalliques à l'extérieur est une stratégie de résistance fréquente, et rend moins aisé le retour des ions toxiques vers l'intérieur à cause de leur insolubilité.

La synthèse du complexe CzcCBA dépend d'une régulation à deux composants (encore une) composée de CzcR et CzcS. Un autre complexe bâti sur le même principe et homologue du précédent est codé par pMOL28 dans la souche CH34. Il s'agit du système Cnr qui confère la résistance au **cobalt** et au **nickel**. Sa mise en œuvre montre un dispositif intéressant. Comme la plupart des résistances aux facteurs étrangers, ce système est inductible, c'est-à-dire qu'il est fabriqué lorsque les métaux à expulser sont présents en excès. Il est donc fondé sur des protéines régulatrices. Il y en a trois : CnrH, CnrX et CnrY. Les gènes sont disposés en deux opérons, les promoteurs étant indiqués par les flèches **[51]** :



Les opérons cnr

Le pompage vers l'extérieur se fait par CnrA, CnrB et CnrC. L'opéron correspondant est commandé par un autre opéron dont l'expression est déclenchée surtout par les ions Ni^{2+} à une forte concentration (0,2 mM), et dans une moindre mesure par les ions Co^{2+}, Zn^{2+}, et chromate. Une délétion de cet opéron régulateur *cnrYXH*, empêche en grande partie la synthèse du complexe de pompage. La présence du gène régulateur *cnrH* tout seul favorise au contraire une synthèse maximale du

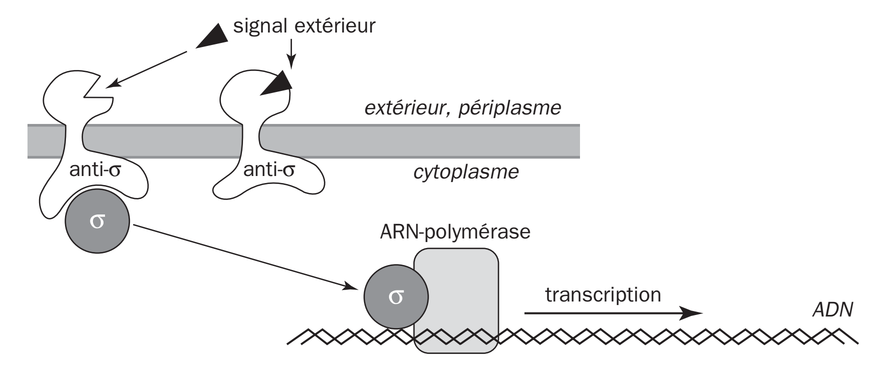
complexe. Explication : le gène **cnrH** code pour un ***facteur sigma**** autorisant le démarrage de la transcription par l'ARN-polymérase à partir des deux promoteurs. Comment le réglage fonctionne-t-il ? Les protéines CnrX et Y formeraient un ensemble périplasmique. qui viendrait s'associer à ce facteur sigma (CnrH) et bloquerait son action lorsque le taux de métal dans le périplasme est très faible. C'est la partie CnrX qui reconnaît cette situation. Cet élément fixe l'ion métallique et transmerait l'information à CnrY, qui agirait à son tour sur CnrH en bloquant son action. Il y aurait donc une cascade d'information du nickel à CnrX, puis vers CnrY. Celui-ci bloquerait alors le facteur sigma CnrH. La transcription en aval étant entravée, la synthèse de la pompe exportatrice serait ainsi mise en veilleuse.

Que se passe-t-il quand le nickel est en excès ? Le complexe CnrXY devient saturé par Ni^{2+} et se détache de CnrH. Le facteur sigma étant libéré, la transcription peut commencer au niveau des deux promoteurs. Il en résulte une induction simultanée de toutes les protéines, CnrX, CnrY, CnrH et la pompe CnrCBA. La raréfaction du nickel devrait entraîner un retour à la case départ avec blocage de la transcription. En fait il y a toujours une petite synthèse résiduelle des protéines périplasmiques car sans cela les cellules deviendraient peu à peu incapables de détecter la présence du nickel. Pourquoi un dispositif aussi compliqué dans *R. metallidurans* ? Nous savons que cette espèce est chimio-lithotrophe et peut se développer sur H_2 et CO_2. Or le nickel lui est absolument nécessaire pour le fonctionnement de ses hydrogénases ! Le transport d'un minimum de nickel est requis, mais le système de reflux CnrABC se charge de chasser un trop-plein éventuel. Les bactéries sont donc armées pour faire face aux situations extrêmes.

Le facteur sigma appelé ici **CnrH** sera pour nous le prétexte d'évoquer une question intéressante d'importance générale. Il suffit de se rappeler la nature exacte d'un facteur sigma ou *facteur d'amorçage** de la transcription. Pour transcrire tous les gènes de son patrimoine, la cellule dispose de plusieurs facteurs sigma, chacun étant capable de reconnaître un type déterminé de promoteur. Il existe des promoteurs courants concernant la transcription d'un grand nombre de gènes et reconnus par sigma-70. D'autres promoteurs intéressent une partie spécialisée de l'économie cellulaire : métabolisme azoté, choc thermique... Un facteur sigma particulier, codé par *rpoE*, a été découvert initialement chez *E. coli* et a reçu le nom de sigma-E ou sigma-23. Il correspond à une nouvelle famille ou facteurs ECF (*extracytoplasmic function factor*), capables de déclencher une transcription sous l'effet d'un signal extérieur **[52]**. La protéine CnrH en fait partie. La résistance aux métaux n'est pas la seule à utiliser ce mode de déclenchement par un signal extérieur. Parmi ces derniers, il y a la présence dans le périplasme de protéines abîmées par un choc thermique (sigma-E de *E. coli*), l'action de facteurs d'environnement sur *Pseudomonas aeruginosa* pour la synthèse d'alginate, l'irradiation lumineuse de *Myxococcus xanthus* pour la synthèse de caroténoïdes, et la résistance à la pression chez un *Photobacterium* [9]. La ressemblance du facteur CnrH du *Ralstonia* CH34 avec le sigma-E du colibacille suggère donc que nous sommes en

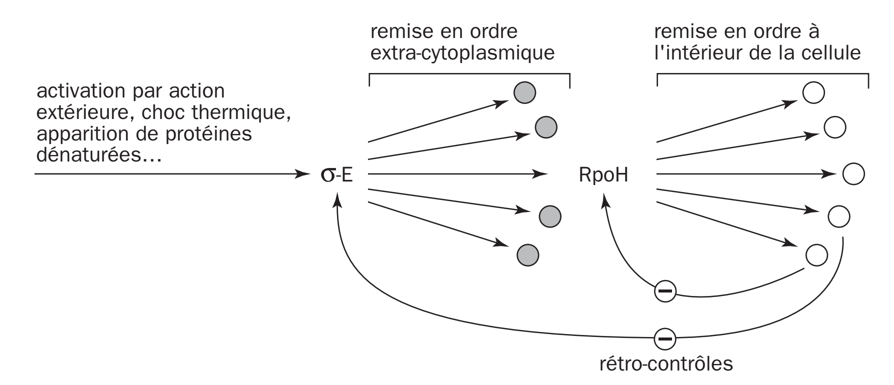
9 - *Une espèce Gram-négative dite barophile, isolée à plus de 5000 m de profondeur et croissant au-dessous de 18 °C, avec un optimum vers 10 MPa de pression. L'adaptation à ces conditions repose sur une régulation*

présence d'un mécanisme anti-stress d'un modèle banal chez les bactéries. Voici la trame simplifiée d'une réponse anti-stress chez *Escherichia coli* :



Facteur sigma de type "ECF"

- Le facteur sigma-E (ou σ-23) est bridé au niveau de la membrane cytoplasmique par deux protéines périplasmiques, RseA et RseB, formant un complexe qui déborde à l'extérieur (comme plus haut les protéines CnrX et Y).
- La détection par ces deux protéines des divers dégâts survenus dans les protéines du périplasme ou dans la membrane externe active le sigma-E. Ce facteur lance la transcription d'une dizaine de gènes. De nouvelles protéines apparaissent. L'une d'elles est une protéase DegP qui va digérer les protéines endommagées, pratique des réparations plus subtiles. Sur la liste des protéines induites figure RpoH.
- La protéine RpoH est elle-même un facteur sigma (ou σ-32), qui lance l'expression d'une série de gènes du choc thermique. Plusieurs protéines nouvelles apparaissent dans le cytoplasme. La machine s'emballe, mais pas pour longtemps car des rétrocontrôles viennent brider à nouveau le fonctionnement de RpoH et de sigma-E, empêchant une véritable amplification des effets à caractère explosif.



Sigma-E chez le colibacille

---

génétique qui ressemble au système rpoE du colibacille. Beaucoup de Photobacterium vivent comme des pathogènes sur les poissons. Ils sont voisins des Vibrio et leur nom vient de leurs propriétés luminescentes.

Nous constatons que l'excès d'un élément métallique est parfois assimilable à un état de stress, contre lequel la cellule peut lutter avec des outils comparables à ceux qui sont observés au cours de diverses agressions comme le choc thermique.

14.9 - MERCURE ET MERCURIELS

Le mercure est présent à l'état de traces dans les roches et dans un sol non pollué, à des taux de l'ordre de 0,01 à 0,02 ppm. Son minerai est le cinabre (HgS) de couleur rose. Le caractère particulier du mercure métallique est d'être à la fois liquide à température ordinaire et relativement volatil, ce qui fait que l'atmosphère en contient une quantité faible qui augmente de près de 1% par an pour cause de pollution. Le mercure est le seul métal présent sous forme de vapeur dans l'atmosphère. Il est transporté à distance et oxydé en Hg^{2+} par action photochimique en présence d'ozone [**53**]. Le mercure se lie facilement au soufre ainsi qu'au carbone. Dans le premier cas des combinaisons insolubles telles que $(RS)_2Hg$ se forment avec les thiols. Dans le second, les produits formés sont le méthylmercure CH_3Hg, ou le diméthylmercure $(CH_3)_2Hg$. La méthylation du mercure est réalisée chez des bactéries et ces produits tendent à s'accumuler dans les invertébrés et les poissons, d'où ils sont transmis à l'homme. Ces méthylations sont catalysées par des enzymes à corrinoïde [10]. Il existe un cycle du mercure dans la nature. Les volcans et les océans sont à l'origine du métal, qui est retenu et immobilisé dans les sols pendant de longues durées sous forme d'ions mercuriques Hg^{2+}. L'activité bactérienne les réduit en Hg^0 volatil. C'est sous la forme mercurique qu'il est entraîné à nouveau vers le sol, où il peut résider pendant des périodes fort longues. Aussi l'érosion des sols, particulièrement dans les pays chauds, est-elle l'un des facteurs qui contribuent à mobiliser le mercure vers les cours d'eau.

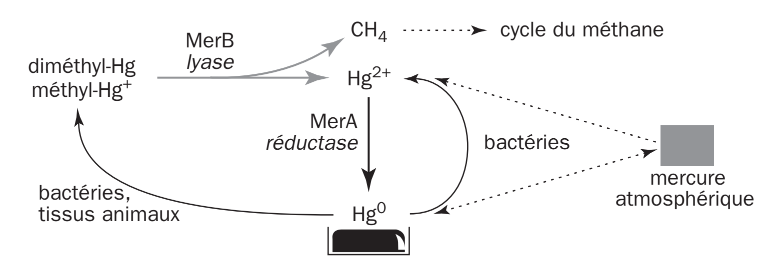
Le mercure est généralement toxique sous ses trois formes différentes : mercure élémentaire (Hg^0), ion mercurique (Hg^{2+}), et composés organomercuriques, dont le principal est le méthylmercure , la forme la plus nocive. La toxicité s'explique par la formation d'une liaison covalente avec les thiols de nombreuses enzymes. La contamination par le mercure remonte généralement les chaînes alimentaires sous sa forme méthylée qui ne s'élimine que très lentement. Les principales sources de contamination viennent de rejets variés (médicaments, herbicides, fongicides, piles, lampes fluorescentes, contacteurs, thermomètres...), sans oublier la pollution atmosphérique globale de l'hémisphère nord. En Amérique du Sud (Guyane, Brésil), l'orpaillage entraîne une forte contamination des sols et des rivières par le mercure. Chaque kilogramme d'or extrait consomme au moins 1,2 kg de mercure élémentaire, dont une partie est rejetée dans l'atmosphère. Des taux significatifs peuvent se trouver dans la chair des poissons du grand large et s'élever à 1 µg/g (en poids sec). La contamination des poissons de rivière par le méthylmercure peut atteindre des taux très élevés, de 500 à plus de 5000 µg/g ! L'exposition au mer-

---

10 - Le méthyl-mercure se prépare facilement (mais dangereusement) par réaction du chlorure mercurique sur la méthyl-cobalamine (analogue de la vitamine B12).

cure reste modérée en France, mais notre ingestion moyenne par semaine peut s'élever à une centaine de microgrammes, soit environ un tiers de la dose jugée maxima par l'OMS. Elle viendrait essentiellement de la consommation de gros poisson. La détection de la contamination chez l'homme se fait surtout au niveau des cheveux. Une prise de conscience mondiale des dangers de la pollution par le mercure a eu lieu à la suite du drame de Minamata, au Japon. Entre 1932 et 1968, la compagnie Chisso spécialisée dans l'industrie des fertilisants, des parfums et des matières plastiques [11], déversa sans précaution dans la baie des résidus contenant du mercure pour un total estimé à 27 tonnes. La population habituée à manger du poisson a été gravement contaminée, plus de 800 personnes ont été atteintes par des troubles neurologiques graves, 46 en moururent et beaucoup souffrirent d'un handicap irréversible. La firme responsable, réputée performante, est devenue pour longtemps le symbole des traitements désinvoltes infligés à l'environnement et aux populations quand la recherche du profit maximum prime sur tout le reste. Un autre méfait à mettre sur le compte de l'inconscience ou de l'ignorance est la pollution de l'Amazonie brésilienne par les chercheurs d'or. On estime que la distillation de l'amalgame par les "garimpeiros" avec des moyens rudimentaires laisserait échapper 30-40% du mercure dans l'atmosphère. Le mercure utilisé en grande quantité pour l'extraction a gravement contaminé le sol, les eaux et la faune.

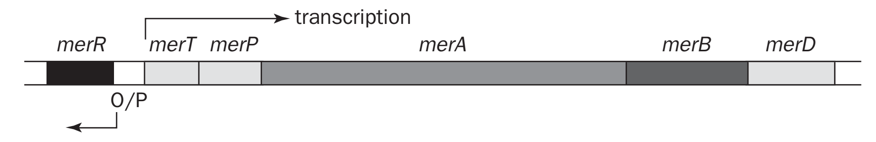
De gros efforts techniques et législatifs ont été consacrés un peu partout pour contrôler l'épandage du mercure et de ses composés. Chose curieuse, c'est dans l'atmosphère sous forme de vapeur très diluée que le mercure pose le moins de problème. La décontamination biologique des eaux et du sol consiste donc à transformer le mercure en Hg^0, afin qu'il s'échappe dans l'air ambiant. Le mercure libre est beaucoup trop dilué pour avoir une action toxique. Quant aux ions mercuriques, ils restent piégés par les acides fulviques du sol ou sur les thiols des sédiments. La dépollution des composés mercuriels par les bactéries repose sur deux opérations essentielles. La première est la rupture par une lyase intracellulaire, de la liaison C–Hg dans les composés organiques comme le méthyl-Hg ou le phényl-Hg, et le mercure est libéré à l'état d'ions Hg^{2+}. La deuxième est l'action d'une réductase mercurique qui transforme les ions Hg^{2+} en mercure élémentaire (Hg^0).



Cycle simplifié du mercure

11 - *Chisso veut dire Azote, en japonais. L'un des produits de base était l'acétaldéhyde, dont la fabrication peut se faire par pétrochimie à partir de l'acétylène (hydratation en milieu sulfurique contenant $HgSO_4$ comme catalyseur).*

En 1974 ont été récoltés dans une collection hospitalière près de 800 plasmides de résistance aux antibiotiques. Leur examen après introduction dans le colibacille a révélé qu'un quart de ces plasmides comportaient des gènes de résistance au mercure [**54**]. La disposition des gènes sur transposon est à peu près toujours la même et les recherches ont mis l'accent sur quelques cas, tels que Tn21 (dans R100 de *Shigella flexneri*), Tn501 (dans PVS1 de *Pseudomonas*), et le plasmide pDu1358 de *Serratia marcescens* **[55]**. La structure de la région *mer* dans ce dernier est indiquée par un diagramme :



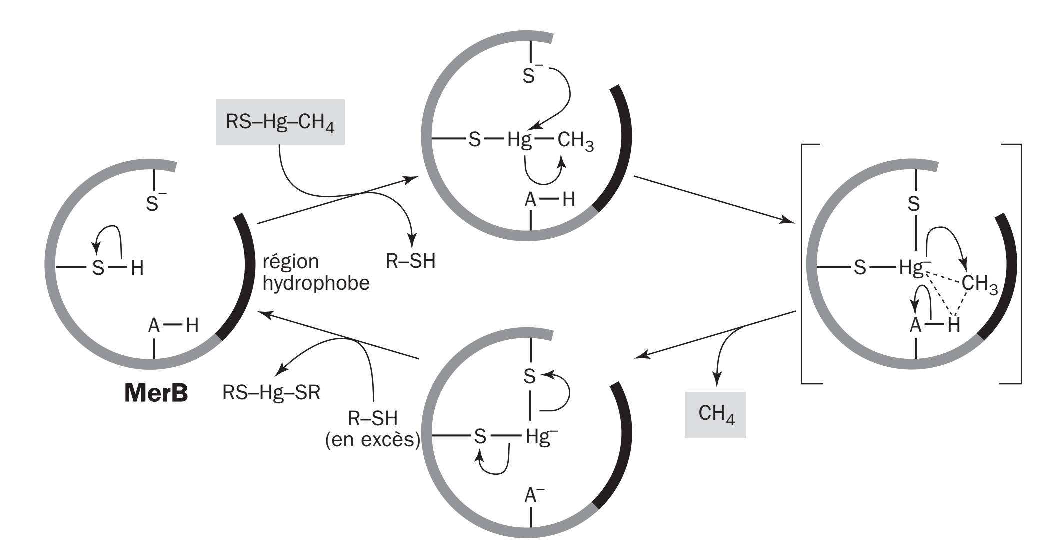
Protéine	**Fonction**
merR	p. régulatrice agissant comme répresseur sur la région opérateur/promoteur (O/P)
merT	protéine membranaire de transport des ions Hg^{2+}
merP	capte les ions Hg^{2+}, les cède à MerT
merC	deuxième route de transport de Hg^{2+}
merA	réductase mercurique, contient FAD, utilise NADPH comme source d'électrons
merB	lyase organomercurique, confère la résistance au méthylmercure
merD	protéine régulatrice accessoire

Opéron mer de pDU1358

Ce schéma est soumis à des variations d'un plasmide à l'autre. Le gène *merB* n'est pas toujours présent chez les bactéries Gram-négatives. Il confère une résistance à large spectre, qui s'exerce non seulement sur les ions mercuriques mais sur le phényl- ou le méthylmercure. La résistance des bactéries dépourvues de *merB* est dite à "spectre étroit". L'ordre des gènes est parfois différent, comme chez *Thiobacillus*, qui renferme deux gènes régulateurs *merR1* et *merR2*, et deux gènes *merA* dont l'un n'est pas fonctionnel **[56]**. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de réviser d'anciennes données. Par exemple *Pseudomonas* K62, qui est la première souche étudiée dans les années 1970 pour sa résistance au mercure, a non pas un seul gène *merB* impliqué dans la résistance aux organomercuriques, mais un second spécifique pour la résistance au phénylmercure **[57]**.

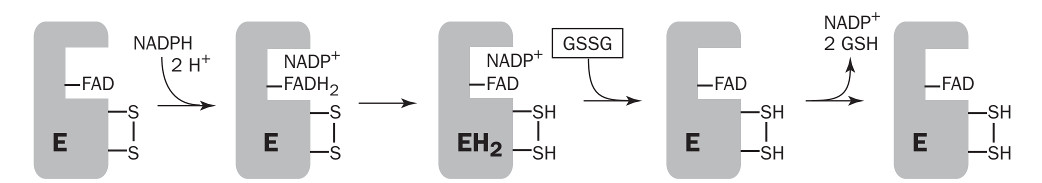
Voici un schéma de fonctionnement pour la **lyase MerB** sur un organomercuriel, un thiolate de méthylmercure **[58]**. Le site catalytique renferme deux positions thiol et une région hydrophobe. Le mercuriel est scindé en trois parties. Les chimistes prévoient un état de transition (cas des réactions d'élimination SE2) symbolisé entre crochets. L'enzyme a besoin d'un thiol externe noté R-SH pour se débarrasser du mercure.

MerP et MerT sont des protéines de transport de Hg^{2+}, la première étant périplasmique et la seconde membranaire. Un troisième facteur MerC est parfois présent (*Thiobacillus*). On a comparé ces transporteurs à une paire de gants de base-ball, le métal étant niché dans chaque cas sur deux thiols logés dans une cavité.



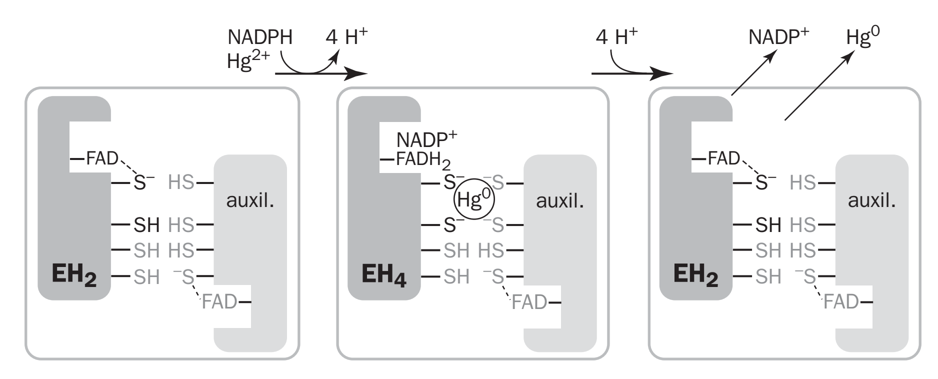
Il saute d'un gant à l'autre, de dithiol en dithiol, mais sans passage à l'état libre. Les ions mercuriques affectionnent les sulfures et thiols, et c'est sur des groupes thiols qu'ils se retrouveront dans MerA, la réductase. Les mutants dépourvus d'un transport efficace des ions mercure continuent à s'imbiber des organomercuriques sans avoir besoin de ces protéines, car leur caractère lipophile facilite le passage à travers la membrane.

On connaît assez bien le fonctionnement de la **réductase mercurique** ou **MerA**, l'enzyme de *Bacillus* ayant été cristallisée et analysée aux rayons X **[59]**. Les homologies de séquence montrent que l'enzyme fait partie d'une famille d'oxydo-réductases organisées en deux sous-unités symétriques portant chacune un site catalytique. La glutathion réductase et la *lipoamide réductase** font partie du même groupe. Ces réductases oxydent NADH ou NADPH, ont toujours du FAD lié de façon covalente et renferment un site dithiol essentiel. La **glutathion réductase** fournit le modèle de fonctionnement pour un site. Le glutathion oxydé sera symbolisé ici par GSSR, le glutathion réduit par GSH.



Le schéma suivant nous à aidera à comprendre le fonctionnement de la réductase mercurique où deux sous-unités fonctionnant sur ce mode participent à la liaison du mercure [**60**].

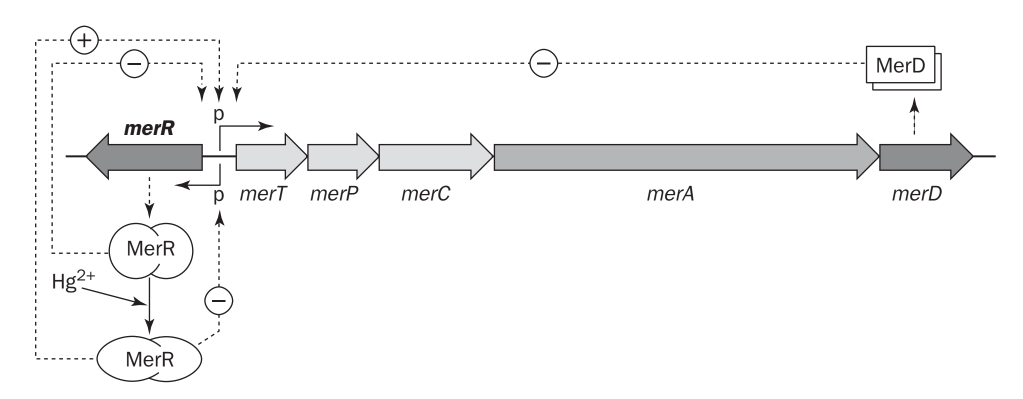
La protéine réduite en EH_2 sur les deux thiols du site actif est réduite à nouveau en EH_4 par NADP. Le cycle catalytique représenté sur un seul site s'effectue donc entre le stade EH_2 muni de ses deux thiols et le stade EH_4 possédant à la fois une flavine réduite et deux thiols.



Réductase mercurique

La protéine dispose en outre d'une paire de cystéines supplémentaires pour lier le métal. Le stade EH_4 retourne à EH_2 en cédant deux électrons à l'ion mercurique. Chaque sous-unité sert ainsi d'auxiliaire pour celle d'en face en apportant à la coordination du mercure deux thiols supplémentaires qui n'existent pas dans les autres réductases de la même famille. Le mercure est donc lié ici par 4 atomes de soufre.

Comment les ions Hg^{2+} sont-ils introduits dans la cellule ? L'un des facteurs responsables est la protéine **MerP** localisée dans le périplasme et porteuse de deux thiols libres **[61]**. Le passage à travers la membrane cytoplasmique est assuré par une petite protéine de 116 acides aminés, **MerT**. Le contrôle génétique de la résistance au mercure est devenue une question classique **[62]**, le système le plus connu étant l'opéron *merTPCAD* porté par les **transposons** Tn21, TN501. Cet opéron renferme les gènes d'un système de transport (*merTPC*), celui de la réductase mercurique (*merA*) et un gène régulateur (*merD*) qui bloque l'expression de l'opéron quand les ions mercuriques Hg^{2+} ont été réduits en Hg^0. L'opéron *mer* du plasmide pDU1358 contient en outre un gène *merB* pour la lyase qui scinde le méthylmercure, situé entre *merA* et *merD* (voir un schéma précédent). Le schéma suivant représente l'opéron mer du transposon Tn21 de *Shigella flexneri* **[63]**.



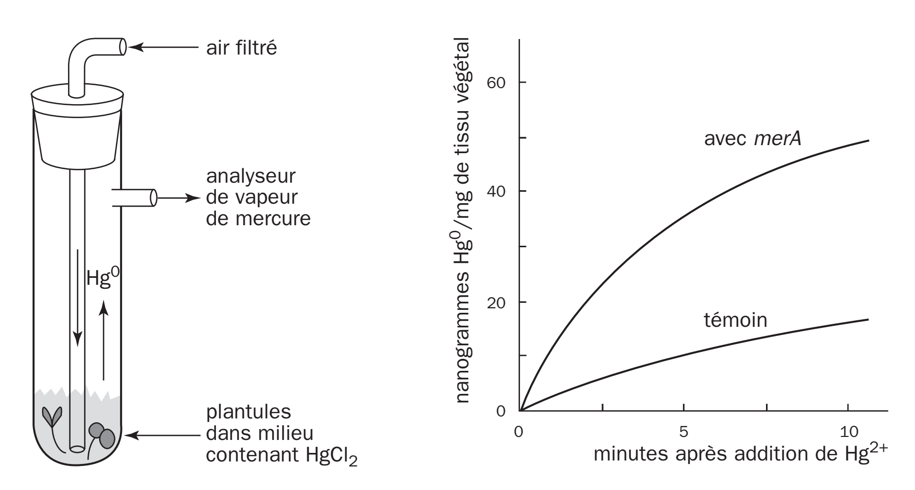
Opéron mer

Deux transcriptions partent en sens contraire d'un promoteur (p). La protéine régulatrice **MerR** est un dimère qui se lie à l'ADN dans la région des promoteurs, mais son effet n'est pas le même selon que ce facteur a lié ou non du mercure. En présence des ions Hg^{2+}, MerR active la transcription de l'opéron *merTPCAD*. Il la réprime en leur absence (signes + et –). De plus, la protéine MerR gêne la transcription de son propre gène. Enfin la protéine MerD se lie également au promoteur de l'opéron sur le même site que MerR, et contribuerait au réglage fin de l'ensemble. La liaison les ions mercuriques avec MerR est très forte, la constante de dissociation étant de l'ordre de 0,01 µM. MerR lie aussi avec moins d'affinité d'autres métaux comme Cd(II), Zn(II), Au(I) et Au(III).

Le facteur MerR a servi de modèle pour mieux comprendre le principe des associations entre protéines régulatrices et ADN. Dans le cas présent, MerR est à la fois activateur et répresseur, et semble infliger dans les deux cas une distorsion locale à l'ADN. Le caractère essentiel de ce système est de pouvoir basculer avec une grande sensibilité de l'activation de l'opéron à un blocage pur et simple **[63, 64]**. MerR est une protéine allostérique pouvant sauter d'une conformation à une autre selon qu'il y a liaison ou non avec un ion métallique. Il n'y a peut-être pas de différence fondamentale entre l'activation et la répression à ce niveau, parce que MerR s'installe dans les deux cas au niveau du site promoteur et favorise l'accès de l'ARN-polymérase à l'état du complexe dit ouvert qui est nécessaire au démarrage de la *transcription**. Dans le cas de la répression, MerR n'empêcherait pas le complexe ouvert de se former, mais empêcherait l'ARN-polymérase de démarrer. La liaison avec le mercure entraîne un changement structural favorisé par le mode de liaison de l'ion Hg^{2+} sur trois thiols de cystéine, dont deux se trouvent sur un monomère, le troisième sur l'autre. Il en résulte un arrangement dissymétrique qui fait que la protéine ne lie qu'un seul ion métallique bien que le dimère dispose théoriquement de deux sites **[65]**. Des remplacements d'acide aminé par mutation permettent à MerR de fixer préférentiellement le cadmium plutôt que le mercure, mais il n'y a pas encore d'explication complète sur le comportement de ce régulateur faute d'en connaître la structure détaillée.

Ce sujet mérite un bref détour vers les végétaux. On a remarqué depuis longtemps la capacité qu'ont certaines plantes vivant près des exploitations minières de résister à de très fortes concentrations métalliques et d'accumuler selon les cas de l'arsenic, du cadmium, du cuivre, du cobalt, du sélénium, ainsi que du mercure. L'idée est venue d'utiliser les plantes pour nettoyer le terrain par **phytoremédiation**. L'imprégnation métallique d'un organisme vivant requiert en général une chélation par des protéines spéciales, comme les phytochélatines végétales et les métallothionéines des animaux. Malheureusement les plantes résistantes ne sont pas aussi courantes qu'on le souhaiterait. Peut-on rendre résistantes des espèces qui ne le sont pas ? L'opération a été réalisée au cours des dernières années sur *Arabidopsis thaliana* malgré quelques complications techniques. Elle a consisté à introduire dans un ADN vecteur un gène *merA* provenant de Tn21, et à l'injecter dans les plantules par l'intermédiaire d'*Agrobacterium**. Les plantules transgéniques devenaient beaucoup plus résistantes aux ions mercuriques que les plantules témoins, pouvant supporter des teneurs allant de 20 à 100 µM **[66]**. Le dessin inspiré de RUGH et coll., représente le principe expérimental. Après addition

d'un sel mercurique (25 µM), les vapeurs de mercure produites sont entraînées et analysées. Les plantes transformées, où toute bactérie est absente, dégagent nettement plus de mercure que les plantes de départ, au-dessus d'un bruit de fond né en grande partie de réactions non spécifiques [12].



Réduction des ions mercuriques par des plantules d'Arabidopsis transgénique

Chose amusante, les auteurs ont observé que certains *Arabidopsis* transformés et rendus résistants ne pouvaient plus se passer des ions mercuriques pour se développer ! Les plantes étaient également résistantes aux sels d'or (Au^{3+}). Nul doute que ces expériences devraient valoir effectivement de l'or pour les laboratoires à la recherche d'un contrat ! Forts de ces résultats, les chercheurs ont effectué la même opération de transfert génétique avec *merB*, qui détermine la synthèse de la lyase dans *Arabidopsis thaliana* à l'aide d'un promoteur en place **[67]**. La plante transformée résiste facilement à des concentrations de méthylmercure allant jusqu'à 2 µM qui seraient létales pour les plantes non-transformées. L'insertion simultanée de *merA* et *merB* a été réalisée plus récemment. Comparée à la plante normale, l'*Arabidopsis* transformée peut se développer sur des concentrations de méthylmercure 50 fois plus élevées !

La phytoremédiation attire l'attention des spécialistes chargés de décontaminer les sols, parce que de nombreuses plantes sont capables d'apporter des solutions, soit par les micro-organismes qu'elles attirent au contact de leurs racines, soit par leur faculté d'extraire des substances comme ici les métaux. Le mercure a l'avantage de se voir expulsé dans l'atmosphère. Les autres métaux sont au plus piégés sous une forme moins toxiques ou déplacés d'un endroit à un autre. Les plantes chargées d'éléments métalliques sont prélevées, brûlées, et les cendres sont stockées ou traitées pour en extraire le métal.

---

12 - Par la photosynthèse les végétaux produisent des corps réducteurs. En outre il y a des oxydoréductions spontanées avec la matière organique.

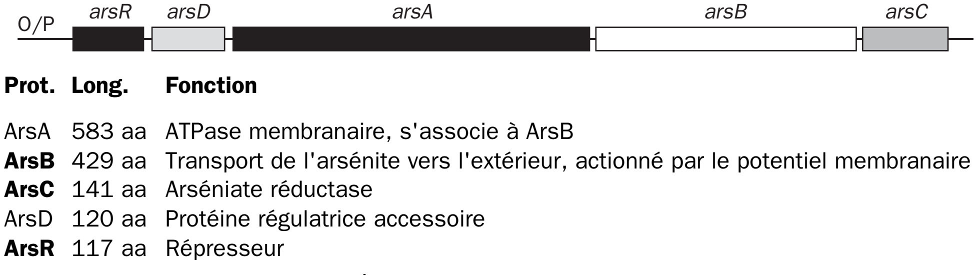
14.10 - Résistances à l'arsenic et à l'antimoine

L'arsenic et l'antimoine ne font pas partie des métaux proprement dits, mais en ont certaines propriétés. Ils donnent lieu comme eux à des phénomènes de résistance. Le minerai le plus répandu est un sulfure de fer et d'arsenic FeAsS ou **mispickel**, ou arsénopyrite, dont l'une des sources en France est la mine d'or de Salsigne dans l'Aude. L'arsenic y a été exploité surtout à une certaine époque avant 1910 quand il était employé principalement comme fongicide. Cette mine a été exploitée pendant des siècles et contient aussi du cuivre, du bismuth et de l'argent. En 1982, on avait déjà extrait 71 tonnes d'or, 200 d'argent, 1300 de bismuth, 20 000 de cuivre et 325 000 d'arsenic ! Son exploitation était surtout celle de l'or avant sa fermeture en 2004. Le métal précieux est dispersé dans l'arsénopyrite, dont il fallait traiter une tonne pour récupérer 5-7 g d'or. L'accumulation de l'arsenic pour lequel il n'y avait plus de marché suffisant a nécessité un stockage volumineux et un risque énorme de pollution dans la région, devenant l'objet d'une vive préoccupation au cours de ces dernières années, vu les grandes quantités de scories laissées à l'abandon. La contamination touche les cours d'eau (des taux de 50 mg et plus d'As ont été relevés localement), et les terres cultivables sont contaminées par les poussières.

L'arsenic a des analogies avec le phosphore par ses propriétés, et presque toutes les molécules contenant de l'arsenic sont toxiques. Au niveau le plus oxydé ou As(V), l'ion arséniate (AsO_4^{3-}) correspond à l'acide ortho-arsénique et se comporte comme un analogue de l'ion phosphate. Le niveau intermédiaire, ou As(III), est celui de la plus grande toxicité ; il correspond aux arsénites et à l'anhydride arsénieux As_2O_3, ou dans la nature à un minerai appelé orpiment (As_2S_3). L'anhydride arsénieux est la poudre blanche ressemblant à de la farine, presque sans saveur ni odeur, le poison célèbre qui a inspiré la fameuse comédie *Arsenic et vieilles dentelles* mise au cinéma par Frank Capra, et les humoristes l'ont fait appeler poudre de succession. L'orpiment a une couleur jaune vif utilisée dans des peintures. Un arsénite (AsO_2^-) se lie aux fonctions thiols des protéines, notamment les sites dithiols de la thiorédoxine et de la glutarédoxine. L'antidote est le 2,3-dimercaptopropanol. La forme la plus réduite de As correspond aux arséniures et à l'hydrogène arsénié AsH_3. L'activité bactérienne du sol transforme facilement l'arsenic en mono- et diméthyl-arsenic, qui sont des formes très toxiques. L'antimoine est placé au-dessous de l'arsenic dans la classification périodique et donne des combinaisons chimiques comparables. Il est relativement courant dans les roches sous forme Sb(V) dans la stibine (Sb_2S_3).

Un certain nombre d'espèces Gram-positives et -négatives étudiées pour leur résistance à l'arsenic et à l'antimoine paraissent employer le même mécanisme de base qui leur est conféré par des gènes plasmidiques groupés en **opérons ars** et présentant de fortes homologies d'une espèce à l'autre. Dans ce cas de figure, l'arséniate est réduit en arsénite. Le dispositif complet se rencontre chez *Escherichia coli* R773 et R46. Le plasmide est présent en plusieurs exemplaires dans les bactéries résistantes, et chaque opéron est soumis à répression par la protéine **ArsR [68]**. L'induction par un taux faible d'arséniate lève l'inhibition et

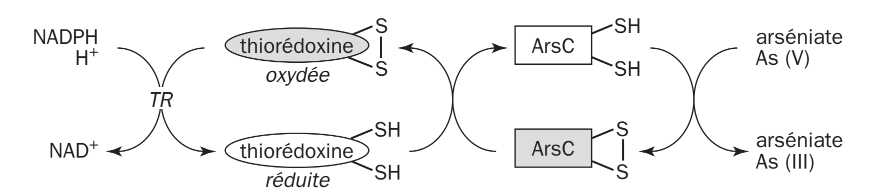
permet l'expression des gènes successifs sous le contrôle de ArsD, qui agirait comme une sorte de valve. La longueur en acides aminés (aa) et la fonction des différentes protéines dérivées sont indiquées par un tableau.



Prot.	Long.	Fonction
ArsA	583 aa	ATPase membranaire, s'associe à ArsB
ArsB	429 aa	Transport de l'arsénite vers l'extérieur, actionné par le potentiel membranaire
ArsC	141 aa	Arséniate réductase
ArsD	120 aa	Protéine régulatrice accessoire
ArsR	117 aa	Répresseur

Opéron ars du plasmide R773

Les deux protéines les plus importantes sont **ArsC** et **ArsB**. La première a une action malencontreuse, car elle réduit l'arséniate en une forme bien plus toxique, l'arsénite. Le facteur ArsC utilise indirectement NADPH comme donneur d'électrons. Le mécanisme observé chez *Staphylococcus* met en jeu une **thiorédoxine** et une thiorédoxine réductase (signalée par *TR*). Dans d'autres cas, une glutarédoxine remplace la thiorédoxine, et le principe reste le même par l'alternance entre formes dithiol et disulfure **[69]**.



Réduction de l'arséniate

Le passage de l'arséniate à une forme bien plus toxique peut paraître une opération fort délétère pour la cellule. En fait il n'en est rien parce que l'arsénite est rapidement évacué par une pompe qui est ArsB. La source d'énergie est la force protonmotrice Δp. C'est là qu'intervient un système très intéressant. La protéine **ArsA** est une ATPase qui est capable de s'associer à ArsB. Lorsque le complexe membranaire ArsA/ArsB est formé, l'ensemble fonctionne comme une pompe actionnée par l'hydrolyse d'ATP. C'est un cas particulier où les bactéries peuvent jouer sur les deux sources d'énergie habituelles, le potentiel membranaire d'un côté, le potentiel ATP de l'autre **[70]**. D'autre part, la protéine ArsA est intéressante sur le plan biochimique. C'est un dimère où chacune des deux parties a deux domaines homologues articulés sur une zone flexible. Chaque domaine a un site d'hydrolyse d'ATP. Il y en a donc quatre pour la molécule entière. L'arsénite est piégé par des fonctions thiol, peut-être au sein d'un même monomère comme indiqué par le croquis **[71]**.

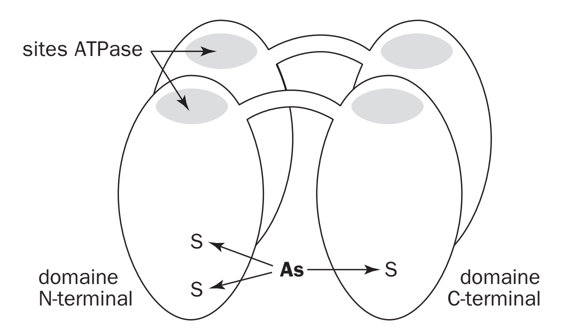
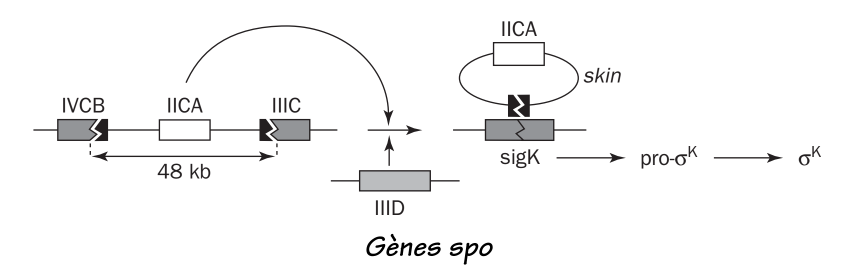


Diagramme structural du dimère de ArsA

Revenons à la structure de l'opéron *ars*. On dispose maintenant d'un certain nombre de séquences plasmidiques obtenues à partir de *Staphylococcus aureus*, *S. xylosus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. L'ordre est le même et les séquences sont ressemblantes, mais les gènes *arsA* et *arsD* peuvent manquer à l'appel, notamment chez les staphylocoques. Seules sont toujours présentes les protéines ArsB, ArsC et ArsR dans les souches résistantes, et c'est pourquoi elles ont été signalées plus haut en caractères gras dans le tableau. Autre fait singulier : la résistance à l'arsenic et à l'antimoine n'est pas toujours portée par un plasmide. Les souches de colibacille dépourvues de plasmide montrent une résistance non négligeable, et on a découvert que le chromosome renferme des gènes *arsR*, *arsB* et *arsC* regroupés dans un opéron homologue de celui qui a été décrit dans le plasmide, hormis l'absence des gènes A et D **[72]**.

Le cas particulier de *Bacillus subtilis* laisse apercevoir une situation étrange **[73]**. Cette espèce banale de l'environnement est connue pour ses endospores extrêmement résistantes. La sporulation est déclenchée par une carence nutritive. Dès les premiers stades, une division donne naissance à deux cellules très différentes, la cellule mère et la préspore qui reste englobée dans la première. La maturation de la spore est analogue à une différenciation cellulaire qui met en jeu au moins 80 gènes. La cellule mère de son côté est le siège de nombreuses modifications. L'une d'elles intéresse la résistance à l'arsenic. L'expression de protéines nouvelles dans la cellule mère nécessite un facteur d'amorçage particulier, un sigma, codé par *sigK*. Ce gène n'existe pas au départ, ou plutôt il est constitué de deux parties séparées par une longueur de 48 kb désignés par *spoIIIC* et *spoIVCB* (schéma). C'est l'excision complète du segment de 48 kb qui va permettre de joindre les deux morceaux et de faire un *sigK* fonctionnel. La longueur excisée renferme le gène *spoIVCA*, qui code pour une recombinase spécifique du site nécessaire à cette excision !



Gènes spo

La partie excisée par l'intervention conjointe de la recombinase IVCA et d'une protéine codée ailleurs par *spoIIID* est appelée "skin" [13] par les spécialistes. C'est dans cette partie que se trouvent les gènes *ars* de la résistance à l'arsenic. Derrière un promoteur se trouve un opéron *arsR*, un gène de fonction non identifiée, puis *arsB* et *arsC*. Les trois gènes R, B et C sont homologues de ceux qu'on trouve chez *Staphylococcus*. La partie "skin" est excisée sous forme d'une boucle et code pour une recombinase. Cette question intrigue. Elle suggère l'excision d'un prophage correspondant à un ancien virus hébergé par la bactérie, car l'excision de cette boucle ressemble à celle du bactériophage Lambda. En conditions adverses, l'induction d'un prophage lui permet de s'extirper et de commencer sa multiplication. L'excision ne débouche ici sur rien, mais reconstitue un facteur sigma dont l'utilité est sans doute la raison pour laquelle ce curieux dispositif n'a pas été éliminé. Le produit de *sigK* n'est en fait que le précurseur de ce facteur sigma, qui est transformé en produit définitif par une maturation comportant un point de coupure de la chaîne par une peptidase.

L'étude de ces résistances pose le problème de l'apparition des gènes cités et de leur dissémination à la fois chez les Gram-positifs et -négatifs. Il est probable que les gènes R, B et C sont très anciens, leur présence étant liée à la présence ubiquiste des minéraux et combinaisons chimiques de As et Sb. Les gènes *arsA* et *arsD* auraient pu naître d'un recrutement ultérieur. Les gènes *ars* répandus dans les populations bactériennes auraient été intégrés secondairement dans des plasmides, dont la multiplicité dans les cellules qui les hébergent peut apporter à celles-ci un fort avantage sélectif.

Le problème va au-delà des cas particuliers abordés dans ce chapitre, car il concerne l'évolution et l'adaptation des populations de micro-organismes face à des agents toxiques ou xénobiotiques. Cette question a été abordée par plusieurs auteurs **[74]**. En gros, il s'agit d'obtenir artificiellement des recombinaisons et mutations à partir des trois gènes *ars* (R, B et C) apportés par le plasmide pI258 de *S. aureus* et multiplié dans le colibacille. Un peu comme on bat les cartes avant de jouer, le résultat étant filtré par une forte sélection, aboutissant à l'obtention de cellules capables de se multiplier en présence d'une dose très élevée d'arséniate (jusqu'à 0,5 M !). Il a été possible d'obtenir des opérons recombinés extrêmement performants qui avaient tendance à s'intégrer au chromosome, donc d'occuper une position stable.

Les exemples précédents ont fait état d'une réduction de l'arséniate en arsénite (le couple As(V)/As(III) a un E'° de l'ordre de 60 mV). Le processus inverse, qui est l'oxydation de l'arsénite, transforme celui-ci en une entité moins toxique à l'aide d'une **arsénite oxydase**. L'arséniate formé est ensuite méthylé. Cette propriété semble assez courante chez des *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus* et autres. L'arsénite oxydase la mieux caractérisée est celle d'*Alcaligenes faecalis* **[75]**. L'enzyme de 100 kDa renferme des noyaux fer-soufre et du **molybdène** dans un cofacteur du même type que ceux qu'on trouve dans les molybdo-enzymes. La structure détaillée de la protéine montre qu'elle appartient à un modèle original,

---

13 - Jeu de mots pour "sigK intervening".

avec deux sous-unités très inégales. La première renferme un ion molybdène lié à deux bioptérines et un centre fer-soufre particulier du type [3Fe-4S]. Elle ressemble à la DMSO réductase et à la nitrate réductase dissimilatrice. Le molybdène passe alternativement du stade Mo(IV) à Mo(VI). La seconde sous-unité est une protéine de type RIESKE qui ressemble à celle du cytochrome bc_1. Les plantes peuvent aussi accumuler de l'arsenic et servir de base à une phytoremédiation [**76**]. Un bon concentrateur est *Pieris ensiformis* et son glutathion réduit l'As(V) en As(III). Ce dernier est alors facilement piégé, soit par trois molécules de glutathion pour donner un trithiolate d'arsenic, soit par une phytochélatine. Un travail récent a montré que cette phytoremédiation était améliorable par transformation génétique des plantes. Deux gènes impliqués dans la tolérance d'*E. coli* à l'arsenic ont été insérés dans le génome d'*Arabidopsis*. L'un d'eux est celui qui code pour ArsC, la réductase transformant l'arséniate en arsénite. Le second code pour une gamma-glutamylcystéine synthétase, qui participe à la genèse du glutathion **[77]**. L'arsénite est alors piégé par les thiols et la plante présente une forte résistance à l'arsenic, qu'elle accumule dans ses feuilles. Des essais sont en cours avec d'autres plantes. Une équipe espagnole a montré récemment que le radis mis en présence de taux élevés d'As (1 à 5 mg/L) pouvait le concentrer fortement à des niveaux le rendant impropre à la consommation sans que la plante en subisse des effets toxiques **[78]**. Cette constatation ne peut donc qu'inciter à la prudence dans les cultures industrielles intensives lorsque sont répandus des pesticides arseniqués.

CONCLUSION

Les exemples abordés dans ce chapitre permettent de se faire une idée sur l'intervention des métaux dans les cycles naturels, leur circulation, les oxydoréductions dont ils sont le siège. La contamination grandissante de l'environnement par les rejets métalliques n'est pas seulement directement dommageable pour nous, mais aussi pour la microflore à laquelle on confie la charge des biodégradations. Nous avons vu que les bactéries ont développé des systèmes sophistiqués pour importer les métaux dont elles ont besoin tout en limitant les entrées excessives. Une part de leur énergie, par ATP ou potentiel de membrane, est consacrée au refoulement des excès toxiques. Les systèmes aperçus sont des exemples supplémentaires de mécanismes d'asservissement par lesquels les cellules maintiennent la composition de leur milieu interne.



Pyrite de fer

RÉFÉRENCES

[1] MEYER M, TELFORD JR, COHEN SM, WHITE DJ, XU J & RAYMOND KM (1997) *J. Am. Chem. Soc*. **119** : 10093-10103.

[2] WONG-LUN-SANG S, BERNARDINI V, HENNARD C, KYSLIK P, DELL A & ABDALLAH MA (1996) *Tetrahedron Lett.* **37** : 3229-3232.

[3] WATERS VL (1991) *Microbiol. Rev.* **55** : 437-450.

[4] BOYD PW & coll. (2000) *Nature* **407** : 695-702.

[5] BARBEAU K, RUE EL, BRULAND KW & BUTLER A (2001) *Nature* **413** : 409-4403.

[6] FONTECAVE M, COVES J & PIERRE JL (1994) *Biometals* **7** : 3-8.

[7] HANTKE K (2001) *Cur. Opin. Microbiol.* **4** : 172-177.

[8] BAICHOO N & HELMANN JD (2002) *J. Bacteriol*. **184** : 5826-5832.

[9] PANINA EM, MIRONOV AA & GELFAND MS (2001) *Nucleic. Aids Res.* **29** : 5195-5206.

[10] BAICHOO N, WANG T, YE R & HELMANN JD (2002) *Mol. Microbiol.* **45** : 1613-1629.

[11] MOECK GS & COULTON JW (1998) *Molecular Microbiol.* **28** : 675-681.

12] STOJILJKOVIC I & SRINIVASAN N (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 805-812.

[13] SPRENCEL C, CAO Z, QI Z, SCOTT DC, MONTAGUE MA, IVANOFF N, XU J, RAYMOND KM, NEWTON SM & KLEBBA PE (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 5359-5364.

[14] KAGI JH & SCHAFFER A (1988) *Biochemistry* **27** : 8509-8515.

[45] KOBAYASHI T & ITO K (1999) *Embo J.* **18** : 1192-1198 ;
COLLET JF & BARDWELL JCA (2002) *Molec. Microbiol.* **44** : 1-8.

[16] BROWN GE, FOSTER AL & OSTERGREN JD (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** : 3388-3395.

[17] BOUTRON C (1996) *Pour La Science*, **228** : 34-41.

[18] VEYSSEYRE AM, BOLLHOFER AF, ROSMAN KJ, FERRARI CP & BOUTRON CF (2001) *Environ. Sci. Technol*. **35** : 4463-4469.

[19] Rosman KJR, W. Chisholm W, Boutron CF, Candelone JP & U. Görlach U (1993) *Nature* **362** : 333-335.

[20] Silver S & Phung LT (1996) *Annu. Rev. Microbiol.* **50** : 753-789.

[21] Mergeay M (1991) *Trends Biotech.* **9** : 17-24.

[22] Nucifora G, Chu L, Misra TK & Silver S (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86** : 3544-3548 ; Ivey DM, Guffanti AA, Shen Z, Kudyan N & Krulwich TA (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 4878-4884.

[23] Agranoff DD & Krishna S (1998) *Molec. Microbiol.* **28** : 403-412.

[24] Silver S & Wlderhaug M (1992) *Microbiol. Rev.* **56** : 195-228

[25] Tsai KJ & Linet AL (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **305** : 267-270.

[26] Silver S (1996) *Gene* **179** : 9-19.

[27] Okkeri J & Haltia T (1999) *Biochemistry* **38** : 14109-14116.

[28] Melchers K, Schumacher A, Buhmann A, Weitzeneigger T, Belin D, Grau S & Ehrmann M (1999) *Res. Microbiol.* **150** : 507-520.

[29] Rensing C, Mitra B & Rosen BP (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci* **94** : 14326-14331 ; Beard SJ, Hashim R, Membrillo-Hernandez J, Hughes MN & Poole RK (1997) *Molec. Microbiol.* **25** : 883-891/

[30] Solioz M & Vulpe C (1996) *Trends Biochem.Sci.* **21** : 237-241 .

[31] Grass G, Wong MD, Rosen BP, Smith RL & Rensing C (2002) *J. Bacteriol.* **184** : 864-866.

[32] Grass G, Fan B, Rosen BP, Franke S, Nies DH & Rensing C (2000) *J. Bacteriol.* **183** : 4664-4667.

[33] Leblanc M., Achard B & Personne J.-Ch (1995) *In " Mineral Deposits : from their origin to their environmental impacs"*, Pasava, Kribek & Zak eds, publ. Balkema, Rotterdam : 127-130.

[34] Rensing C, Sun Y, Mitra B & Rosen BP (1998) *J. Biol. Chem.* **273** : 32614-32617.

[35] Mergeay M, Monchy S, Vallaeys T, Auquier V, Benotmane A, Bertin P, Taghavi S, Dunn J, Van der Lelie D & Wattiez R (2003) FEMS *Microbiol Rev.* **27** : 385-410.

[36] Borremans B, Hobman JL, Provoost A, Brown NL & Van der Lelie D (2001) *J. Bacteriol.* **183** : 5651-5658.

[37] Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B & Rosen BP (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** : 652-656 ; Fan B & Rosen BP (2002) *J. Biol. chem.* **277** : 46987-46992.

[38] Odermatt A & Solioz M (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 9217-9221

[39] Odermatt A & Solioz M (1995) *J. Biol. Chem.* **270** : 4349-4354.

[40] Wimmer R, Herrmann T, Solioz M & Wuthrich K (1999) *J. Biol. Chem.* 2**7**4 : 22597-22603.

[41] Phung LT, Ajlani G & Haselkorn R (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 9651-9654 ; Kanamaru K, Kashiwagi S & Mizuno T (1994) *Molec. Microbiol.* **13** : 369-377.

[42] Phung LT, Ajlani G & Haselkorn R (1994) *Proc. Natl. Acad.* Sci. **91** : 9651-9654.

[43] Cooksey DA (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 454-456.

[44] Cooksey DA (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* **14** : 381-386.

[45] Brown NL, Barrett SR, Camakaris J, Lee BT & Rouch DA (1995) *Mol. Microbiol.* **17** : 1153-1166.

[46] Outten FW, Huffman DL, Hale JA & O'Halloran TV (2001) *J. Biol. Chem.* **276** : 30670-30677.

[47] Fan B & Rosen B (2002) *J. Biol. Chem.* **277** : 46987-46992.

[48] ROBERTS SA, WEICHSEL A, GRASS G, THAKALI K, HAZZARD JT, TOLLIN G, RENSING C & MONTFORT WR (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** : 2766-2771.

[49] MERGEAY M, NIES DH, SCHLEGEL HG, GERITS J, CHARLES P & VAN GIJSEGEM F (1985) *J. Bacteriol.* **162** : 328-334.

[50] DONG Q & MERGEAY M (1994) *Mol. Microbiol.* **14** : 185-187 ;
DIELS L, DONG Q, VAN DER LELIE D, BAEYENS W & MERGEAY M (1995) *J. Indust. Microbiol.* **14** : 142-153 ;
RENSING C, PRIBYL T & NIES DH (1997) *J. Bacteriol.* **179** : 6871-6879.

[51] GRASS G, GROBE C, NIES DH (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 1390-1398 ;
TIBARZAWA C, WUERTZ S, MERGEAY M, WYNS L & VAN DER LELIE D (2000) *J. Bacteriol.* **182** : 1399-1409.

[52] MISSIAKAS D & RAINA S (1998) *Molec. Microbiol.* **28** : 1059-1066.

[53] BARKAY T, TURNER R, SAOUTER E & HORN J (1992) *Biodegradation* **3** : 147-159.

[54] SCHOTTEL J, MANDAL A, CLARK D, SILVER S & HEDGER RW (1974) *Nature* **251** : 335-337.

[55] PARK S-J,WIREMAN J & SUMMERS AO (1992) *J. Bacteriol.* **174** : 2160-2171

[56] INOUE C, SUGAWARA K & KUSANO T (1991) *Mol. Microbiol.* **5** : 2707-2718.

[57] KIYONO M, OMURA T, FUJIMORI H & PAN-HOU H (1995) *Arch. Microbiol.* **163** : 242-247.

[58] BEGLEY TP & WALSH CT (1986) *Biochemistry* **325** : 7192-7200 ;
WALSH CT, DISTEFANO MD, MOORE MJ, SHEWCHUK LM & VERDINE GL (1988) *FASEB J.* **2** : 124-130.

[59] MILLER SM, MASSEY V, BALLOU DP, WILLIAMS CH JR, DISTEFANO MD & coll. (1990) *Biochemistry* **29** : 2831-2841 ;
MILLER SM, MASSEY V, WILLIAMS CH JR, BALLOU DP & WALSH CT (1991) *Biochemistry* **30** : 2600-2612.

[60] DISTFANO MD & coll. (1989) *Biochemistry* **28** : 1168-1183 ;
MOORE MJ & WALSH CT (1989) *Biochemistry* **28** : 1183-1194 ;
MILLER SM & coll. (1989) *Biochemistry* **28** : 1194-1205.

[61] QIAN H, SAHLMAN L, ERIKSSON PO, HAMBRAEUS C, EDLUND U & SETHSON I (1998) *Biochemistry* **37** : 9316-9322.

[62] SUMMERS AO (1986) *Microbiol. Rev.* **40** : 607-634.

[63] CAGUIAT JJ, WATSON AL & SUMMERS AO (1999) *J. Bacteriol.* **181** : 3462-3471.

[64] LUND PA & BROWN NL (1989) *J. Mol. Biol.* **205** : 343-353 ;
FRANTZ B & O'HALLORAN TV (1990) *Biochemistry* **29** : 4747-4751.

[65] WRIGHT JG & coll. (1990) *J. Amer. Chem. Soc.* **112**, 2434-2436.

[66] RUGH CL, WILDE HD, STACK NM, THOMPSON DM, SUMMERS AO & MEAGHER RB (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** : 3182-3187.

[67] BIZILY SP, RUGH CL, SUMMERS AO & MEAGHER RB (1999) **96** : 6808-6813.

[68] WU J & ROSEN BP (1991) *Mol. Microbiol.* **5** : 1331-1336 ;
WU J & ROSEN BP (1993) *Mol. Microbiol.* **8** : 615-623.

[69] GI G & SILVER S (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89** : 7974-7978 ;
JI G, GARBER EA, ARMES LG, CHEN CM, FUCHS JA & SILVER S (1994) *Biochemistry* **33** : 7294-7299.

[70] DIELS L & ROSEN BP (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 385-389.

[71] ROSEN BP, BHATTACHARJEE H & SHI W (1995) *J. Bioenerget. Biomemb*. **27** : 85-91.

[72] CARLIN A, SHI W, DEY S & ROSEN BP (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 981-986 ;
DIORO C, CAL J, MARMOR J, SHINDER R & DUBOW MS (1995) *J. Bacteriol.* **177** : 2050-2056.

[73] SATO T & KOBAYASHI Y (1998) *J. Bacteriol.* **180** : 1655-1661.

[74] CRAMERI A, DAWES G, RODRIGUEZ E JR, SILVER S & STEMMER WP (1997)
Nat. Biotechnol. **15** : 436-438.

[75] ANDERSON GL, WILLIAMS J & HILLE R (1992) *J. Biol. Chem.* **267** : 23674-23682 ;
ELLIS PJ, CONRADS T, HILLE R & KUHN P (2001) *Structure* **9** : 125-132.

[76] INGRID J. PICKERING IJ, PRINCE RC, GEORGE MJ, SMITH RD, GEORGE GN & SALT DE (2000)
Plant Physiol. **122** : 1171-1178.

[77] DHANKHER OP, LI Y, ROSEN BP, SHI J, SALT D, SENECOFF JF, SASHTI NA & MEAGHER RB (2002)
Nature Biotechnol. **20** : 1140-1145.

[78] CARBONELL-BARRACHINA AA, BURLO F, LOPEZ E & MARTINEZ-SANCHEZ F. (1999)
J. Environ. Sci. **34** : 661-679.

Glossaire

Accepteur d'électrons - Agent oxydant, organique (fumarate, pyruvate...) ou inorganique (O_2, sulfate, nitrate...), capable de réoxyder le dernier terme d'une chaîne de transporteurs d'électrons (chaîne respiratoire) ou une oxydoréductase (par exemple une oxydase).

Acétoclastique - Se dit de la synthèse du méthane à partir de l'acide acétique.

Acétogène - Bactérie anaérobie du sol utilisant CO_2 comme accepteur d'électrons et formant de l'acide acétique comme sous-produit. Les acétogènes renferment une CO déshydrogénase (voir ce terme). Les premières études détaillées ont porté sur *Clostridium thermoaceticum*.

Acétyl-coenzyme A - CH_3CO–ScoA. Thioester formé entre l'acide acétique et le coenzyme A, à haut potentiel de transfert du groupe acétyle. La scission de la liaison thioester par hydrolyse ou transfert libère une énergie largement suffisante pour un couplage avec la synthèse d'une molécule d'ATP. L'acétyl-coenzyme A ou acétyl-CoA possède une double réactivité, comme donneur d'acétyle dans les réactions d'acétylation, comme nucléophile par le carbone du méthyle. La liaison avec le coenzyme A confère au méthyle une certaine acidité qui n'existe pas dans l'acétate libre (le pKa est abaissé de quelques 20 fois). Dans ce type de réaction, l'acétyl-CoA participe a des réactions de synthèse caractéristiques, comme la formation de l'acide citrique par la citrate synthase, par celle du malonyl-CoA par carboxylation, dans la synthèse d'acides gras et de certains acides aminés. L'acétyl-CoA est un carrefour métabolique essentiel placé à la base de la synthèse des lipides.

Acétyl-coenzyme A synthase - Voir CO déshydrogénase.

Acidophile - Organisme dont l'optimum de croissance est dans la région de pH 1-4.

ACP (*Acyl carrier protein*) **-** Fixe les chaînes acyles par un lien thioester à la place du coenzyme A au cours de la synthèse et de la désaturation des acides gras.

Actinomycètes - Bactéries filamenteuses Gram-positives, à taux élevé de G + C, formant un groupe d'une très grande diversité d'habitants normaux du sol, vivant à un optimum de pH compris entre 6 et 8. Exemples : *Actinomyces, Arthrobacter, Bifidobacterium, Micrococcus, Nocardia, Streptomyces, Rhodococcus*. Forment souvent des structures différenciées, notamment des fructifications aériennes. La fragmentation des hyphes peut former des conidies, faisant office de spores disséminées par le vent. On considère les actinomycètes comme des agents efficaces du recyclage de la matière organique dans les sols. Parmi ces bactéries, les streptomycètes sont particulièrement utiles par leur capacité à fabriquer de nombreux antibiotiques, notamment la plupart de ceux qui sont utilisés à des fins thérapeutiques. Le groupe des *Nocardia* et *Rhodococcus* effectuent des biodégradations variées. Des espèces sont thermophiles, comme *Thermoactinomyces*, croissant à 50°C et formant des endospores résistantes. Voir aussi Gram-positives.

Activateur de transcription - Protéine se liant à une zone spécifique de l'ADN et facilitant l'amorçage de la transcription d'un ou plusieurs gènes situés au voisinage. Contracte une association physique avec l'ARN-polymérase, ou inflige seulement une courbure dans l'ADN et fait intervenir d'autres facteurs. Dans le cas d'une association physique, peut se lier à l'ADN assez loin du site d'amorçage, mais venir au contact de l'enzyme par une courbure de l'ADN infligée par des protéines telles que IHF. Voir Amorçage de transcription. L'activation

de transcription chez les eucaryotes obéit à des mécanismes plus nombreux et complexes, notamment par des *enhancers*.

Acyle - Radical R–CO–, R étant CH_3 (radical acétyle) ou une chaîne hydrocarbonée.

Aérobactine - Sidérophore de la famille des hydroxamates. Voir Sidérophore.

Aérotactisme - Mécanisme analogue au chimiotactisme et commandé par l'oxygène dissous.

Aerotolérant - Organisme n'utilisant pas O_2 mais capable de se développer en sa présence. Exemple : les bactéries lactiques.

Agar - Polysaccharides complexes extraits d'algues marines, contenant environ 70% d'agarose et 30% d'agaropectines. Utilisé comme milieu gélifiant en microbiologie au-dessous de 40-50°C.

Agarose - Polysaccharide tiré d'algues marines, constitué de chaînes linéaires où alternent le *D*-galactose et le 3,6-anhydro-*L*-galactose.

AHDS - 2,6-anthrahydroquinone disulfonate. Substrat utilisé comme analogue des acides humiques dans les études de biodégradations, utilisé dans un test colorimétrique.

AHL - Acyl-homosérine lactone.

Alcalophile - Organisme dont l'optimum de croissance se situe au-dessus de pH 8,5 jusqu'à 10,5.

Alcane (Alkane en anglais) **-** Hydrocarbure saturé (dépourvu de liaisons doubles ou triples).

Alcène - Hydrocarbure non aromatique comportant au moins une double liaison C=C.

Alcool déshydrogénases (ADH) **-** Les plus courantes oxydent les alcools primaires en aldéhyde. On distingue plusieurs séries. Une première catégorie est celle des ADH dépendantes de NAD^+ ou $NADP^+$(EC 1.1.1.1). Celles-ci appartiennent à trois types. Les ADH de type I oxydent les alcools à longue chaîne et fonctionnent avec du zinc. La plus étudiée est l'ADH de cheval. Les enzymes de type II n'ont pas de métal, concernent des alcools à chaîne courte et ont une assez large spécificité (répandues dans le métabolisme). Les enzymes de type III sont communes chez les bactéries, ont généralement du fer. Une deuxième catégorie ne fait pas intervenir NAD^+ ou $NADP^+$, mais du PQQ, un hème ou le F420. La méthanol déshydrogénase périplasmique des bactéries méthylotrophes est à PQQ. Une dernière catégorie est celle des levures méthylotrophes (EC 1.1.3.13) et fonctionnent avec l'oxygène de l'air à la manière des oxydases et possède le plus souvent du FAD.

Aldéhyde oxydase - Enzyme oxydant un aldéhyde en acide carboxylique, l'accepteur d'électrons direct étant O_2.

Aldolase - Enzyme catalysant une aldolisation, c'est-à-dire l'addition sur un aldéhyde d'un groupement carboné à caractère nucléophile, comme la réaction du type : $CH_3–CHO + CH_3–R \rightarrow CH_3–CH(OH)–CH_2–R$, ou encore catalysant la réaction inverse dite parfois rétro-aldolisation. Dans ce dernier cas, il y a scission de la molécule dont l'un des morceaux est un aldéhyde.

Alginates - Polysaccharides poly-anioniques abondants chez les algues brunes (Phaeophycées), également rencontrés dans la parois d'espèces bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*). Ce sont des copolymères de β-D-mannuronate et d'α-L-guluronate (qui diffère du précédent par inversion du carbone n° 5), attachés par les liens 1→ 4 dans une chaîne non ramifiée. L'abondance des deux catégories de monomères et leur agencement dans la séquence du polysaccharide détermine les propriétés. Les alginates bactériens sont caractérisés par l'abondance de groupes acétyles, et chez *P. aeruginosa* sont responsables d'affections bronchiques, notamment dans la mucoviscidose. Chez ces bactéries la synthèse dépend d'une douzaine de gènes groupés en opérons, le premier étant *algD* qui est celui d'une déshydrogénase transformant le GDP-mannose en GDP-mannuronate. Il semble que ce soit l'environnement bronchique dans le cas de fibrose cystique qui déclenche la synthèse, qui est inductible et couramment provoquée par des agents extérieurs. Les alginates forment des gels en présence d'ions calcium, ce qui les prédestine à divers emplois pratiques : épaississants et stabilisants dans l'industrie alimentaire, pâtes utilisées pour les empreintes dentaires, confection de compresses et divers enrobages, immobilisation de

cellules… Les alginates utilisés commercialement sont souvent tirés d'algues brunes de la côte Ouest des Etats-Unis (*Macrocystis*), ou d'algues récoltées sur les côtes européennes (*Laminaria*, *Ascophyllum*).

Allostérie - Modification conformationnelle réversible acquise par une protéine multimérique (plusieurs sous-unités) en fonction de l'attachement spécifique du substrat ou de molécules étrangères, appelées effecteurs. L'action d'un effecteur peut s'exercer sur les sites catalytiques eux-mêmes, ou sur des sites spécifiques distincts. La structure moléculaire peut basculer dans son ensemble entre deux états en fonction des effecteurs présents, ou passer par divers intermédiaires. Les modifications affectent en général les propriétés biologiques de la protéine : activité catalytique, constantes cinétiques, affinité pour d'autres molécules. L'allostérie intervient notamment dans le réglage des voies métaboliques au niveau de l'activité des enzymes (voir Rétro-inhibition), dans le réglage de la transcription par répresseur ou par activateur (induction et répression), et dans le fonctionnement de récepteurs qui sont souvent eux-mêmes dotés de propriétés enzymatiques. L'allostérie peut être considérée comme une manifestation particulière de la flexibilité structurale des protéines dont dépend l'essentiel de leurs propriétés.

Aminotransférase - Enzyme catalysant réversiblement le transfert d'azote entre un acide aminé et un oxoacide sur le mode :

$$R\text{–}CH(NH_2)\text{–}COOH + R'\text{–}CO\text{–}COOH \rightleftharpoons R\text{–}CO\text{–}COOH + R'\text{–}CH(NH_2)\text{–}COOH$$

Le coenzyme caractéristique des aminotransférase est le pyridoxal-5'-phosphate ou PLP. La réaction est réversible. L'acide aminé donneur du groupe aminé est souvent le glutamate, qui est lui-même un point d'entrée de l'azote ammoniacal dans le métabolisme.

Ammoniac mono-oxygenase - Première enzyme de la nitrification (*Nitrosomonas europaea*) oxydant l'ammoniac en hydroxylamine (NH_2OH). Membranaire, stimulée par Cu, offre quelque ressemblance avec la méthane mono-oxygénase, et possède une activité sur le méthane. Inhibée par l'acétylène agissant comme marqueur covalent. Cette enzyme est difficile à purifier.

Ammonification - Libération de NH_3 ou d'ammonium à partir de molécules azotées. De façon plus restrictive, désigne parfois la conversion d'azote organique en ammonium, ou encore la réduction du nitrite (produit à partir du nitrate) en ammonium. Non productrice d'énergie, elle permet probablement aux bactéries de détoxifier le nitrite et de contrôler une chute excessive du potentiel redox en conditions anaérobies, considérée alors comme dissimilation (l'ammonium étant en excès sur les besoins cellulaires). Certains auteurs se contentent de désigner comme ammonification le passage global du nitrate à l'ammonium.

Amorçage de transcription - La synthèse de l'ARN messager effectuée par l'ARN-polymérase s'effectue après reconnaissance de la séquence d'un promoteur par un facteur sigma (ou facteur d'amorçage). Le complexe ARN-polymérase-sigma installé sur l'ADN correspond à ce qu'on appelle le complexe "fermé". Il amorce la transcription à courte distance du promoteur en créant une petite dénaturation locale de l'ADN, et le complexe devient alors "ouvert", indispensable pour que la transcription puisse continuer. Le passage au complexe ouvert exige parfois l'interaction avec une protéine supplémentaire, un activateur de trancription. Voir Transcription.

AMPA - 2-aminométhyl-phosphonate.

AMP cyclique - Adénosine-3',5'-monophosphate cyclique, agit chez les bactéries comme le signal interne d'une demande en énergie, reconnu par CRP, inhibe la répression catabolique.

Anaérobie - Caractérise un environnement dépourvu d'O_2, ou désigne un organisme capable de se développer dans un tel milieu. Les anaérobies stricts voient leur croissance ou même leur viabilité supprimée par la présence d'oxygène moléculaire.

Anaplérotique (Voie) **-** Voie métabolique qui prélève une partie des composés carbonés nés au cours d'une fermentation pour approvisionner des voies de synthèse.

Anhydrase carbonique - Enzyme très répandue catalysant l'interconversion entre CO_2 et hydrogénocarbonate : $CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$. L'enzyme des cyanobactéries, algues, lichens et plantes peut aussi hydrolyser le sulfure de carbonyle (produit dans les sols à partir

du thiocyanate) : $OCS + H_2O \rightarrow CO_2 + HS^- + H^+$. Tous les micro-organismes fixant directement le dioxyde de carbone, par exemple avec la Rubisco, sont amplement pourvus d'anhydrase carbonique pouvant consommer OCS comme analogue de CO_2. L'anhydrase carbonique favorise la fixation de CO_2 dans un milieu alcalin qui déplace l'équilibre en faveur de HCO_3^-.

Anisole - Méthoxybenzène.

Antibiotique - Substance émise par bactérie ou champignon bloquant la multiplication ou la survie d'une gamme plus ou moins étendue de micro–organismes, infectieux ou non. Par extension, un antibiotique est un analogue synthétique d'un produit naturel reproduisant son action. Ils ne correspondent qu'à quelques pour cent des antibiotiques répertoriés. Le tableau donne quelques exemples.

Famille chimique	*Exemples*	*Cible physiologique générale*
Aminoglycosides	Gentamycine, kanamycine	Synthèse des protéines
Ansamycines	Rifampicine	ARN-polymérase
Bêta-lactamines	Pénicilline, ampicilline	Formation de la paroi bactérienne
Bléomycine	Bléomycine	Anti-tumoral, coupure de l'ADN
Chloramphénicol	Chloramphénicol	Synthèse des protéines
Glycopeptides	Vancomycine	Formation de la paroi bactérienne
Macrolides	Erythromycine	Synthèse des protéines
Quinolone	Acide nalidixique	Réplication de l'ADN
Sulfamides, triméthoprine	c-Trimoxazole	Métabolisme de l'acide folique
Tétracyclines	Tetracycline, minocycline	Synthèse des protéines

Antiporteur - Transporteur membranaire catalysant l'entrée d'un substrat dans la cellule et la sortie conjointe, mole pour mole, d'un autre composant. L'échange est le plus souvent très spécifique, potentiellement réversible, mais fonctionne généralement dans un sens déterminé. Les éléments transportés sont des composés organiques ou minéraux, ioniques ou neutres.

Anti-sens (ARN) **-** ARN complémentaire du produit normal de la transcription, notamment de l'ARN messager**.** L'appariement de ce dernier avec un ARN anti-sens bloque son fonctionnement. Les ARN anti-sens interviennent dans certaines régulations.

APS - Adénosine phosphosulfate. Sa formule correspond à celle de l'ADP où le phosphate distal est remplacé par un sulfate. Formé à partir de sulfate et d'ATP par une ATP sulfurylase. L'APS est un donneur de sulfate dans les sulfatations.

ArcA, **ArcB -** Système régulateur à deux composants contrôlant la transcription de gènes métaboliques au cours de l'alternance aérobiose-anaérobiose. ArcB est une histidine kinase transmembranaire. En absence de O_2, ArcA est phosphorylée à partie de ArcB, active les gènes du métabolisme anaérobie, réprime ceux des chaînes aérobies (voir Régulations à deux composants).

Archaebactéries - Ensemble au sein des procaryotes, distincts des eubactéries par leur arbre évolutif et un certain nombre de critères biochimiques. Certaines espèces sont considérées comme proches des procaryotes primitifs des premiers âges de la vie. L'examen des séquences d'ADN et des structures protéiques révèle des caractères qui se retrouvent chez les eucaryotes.

Critère	Nature de la particularité
Ribosomes	Structure. Contient des protéines acides chez les halophiles
ARN-polymérase	Structure plus eucaryotique que procaryotique
Paroi	Pas de peptidoglycanes, couche S, périplasme quasi absent
Membrane	Des phospholipides à deux têtes polaires, di-éthers, tétra-éthers
Coenzymes	Particuliers chez les méthanogènes, n'existent pas ailleurs
Photosynthèse	Absente, sauf phototrophie spéciale chez les halophiles
ATP synthase	Un seul type, rappelle les ATPases vacuolaires des eucaryotes
Potentiel membranaire	Couplage avec oxydations, transferts de méthyle, lumière

Il y a donc un certain nombre de caractères qui rappellent les eucaryotes, d'autres qui sont typiquement ceux des bactéries ou eubactéries. Les voici regroupés dans un petit tableau :

Caractères rappelant les eucaryotes	Caractères rappelant les eubactéries
Mécanisme de réplication de l'ADN, histones, structures type nucléosome	Chromosome circulaire unique, opérons, pas d'introns sauf exception
ARN-polymérase, TATA-box, facteur de transcription	Absence de noyau Porines, transporteurs transmembranaires
Facteurs d'amorçage et d'élongation	Production d'énergie
Protéines des ribosomes, sensibilité à la toxine diphtérique	Nombreux traits métaboliques
Sous-unités de l'ATPase/ATP synthase	

Les archaebactéries ou archaea montrent une grande diversité d'adaptations, sont les seules à coloniser des milieux très acides ou à force ionique très élevée, ou encore à se développer à plus de 95°C… On distingue deux grands groupes, les euryarchaeotes et les crenarchaeotes. Dans les premiers sont les halophiles extrêmes, méthanogènes, thermo-acidophiles. Les seconds renferment surtout des thermophiles extrêmes dépendantes du soufre et différentes formes marines (voir Crenarchaeotes). Leur habitat ne se limite pas à ces environnements extrêmes et elles sont très répandues à tous les niveaux marins, y compris dans les eaux froides des grandes profondeurs. Les archaebactéries représenteraient 20% de toutes les cellules microbiennes marines, et à près de 40% des cellules planctoniques entre – 150 m et les abysses, et beaucoup seraient autotrophes. L'ARN de la petite sous-unité des ribosomes est devenu un outil commode pour analyser la diversité des archaebactéries sans avoir à les cultiver, mais l'éventail réel de leurs propriétés physiologiques reste incomplètement connu, et de nombreuses formes n'ont pas encore été étudiées en laboratoire, ni même *a fortiori* cultivées.

Argiles - Mélange de phyllosilicates hydratés formant des cristaux extrêmement petits, où sont superposés des feuillets composés de couches tétraédriques (ct) et octaédriques (co). Les feuillets sont de type ct-co-ct ou ct-co. Ils sont anioniques. Entre eux se placent des cations : Ca^{2+}, K^+, Na^+, et des molécules d'eau (voir aussi Micas). L'épaisseur des feuillets va de 0,7 nm à 1,4 nm, et l'identification des minéraux très variés se fait par diffraction des rayons X. La kaolinite $Al_4[SiO_4O_{10}]$ $(OH)_8$ est de type ct-co. Elle est caractéristique de l'altération des roches riches en feldspaths (granites, pegmatites). Le minéral le plus courant des roches argileuses est l'illite (ct-co-ct, d'épaisseur 1 nm) dont la structure est proche de celle des micas. La glauconite (trouvée dans les associations minérales désignées par glauconie) est de l'illite fortement chargée en fer. Les smectites et la montmorillonite ont des teneurs variables en Al, Fe, Mg, Na. Les vermiculites naissent de la biotite après perte du potassium. Avec les smectites, elles augmentent fortement en volume par chauffage. Les nombreux minéraux argileux sont des minéraux d'altération (cas le plus fréquent, argiles détritiques

dites argiles primaires) ou ont été créés par recristallisation au sein des sédiments ou des roches magmatiques (argiles secondaires). Tous ces minéraux subissent des évolutions complexes par adjonction d'ions, migration d'éléments.... L'étude des argiles est pratiquement une science en soi. Dans le langage courant le terme d'argiles désigne non seulement les minéraux argileux, mais les roches argileuses dont ils représentent au moins la moitié. Les roches argileuses sont abondantes dans les formations marines ou continentales, alternent souvent avec des niveaux calcaires ou gréseux dans les sédiments. Par leur caractère imperméable, les couches argileuses jouent un rôle très important dans la circulation et l'accumulation des eaux souterraines, les accumulations de matières dissoutes ou de polluants. Certains terrains argileux ont des inclusions caractéristiques, comme les argiles à silex du Miocène dans le Bassin parisien, considérés comme des sols fossiles, ou des cailloux d'origine morainique ou fluvioglaciaire. Enfin dans les pays calcaires sont courantes les argiles de décalcification qui viennent combler les dépressions dans les zones karstiques.

ARN 16S - Voir ARNr.

ARN anti-sens - Voir Transcription et Anti-sens.

ARN-polymérase - Enzyme catalysant la synthèse de l'ARN cellulaire en reproduisant la séquence contenue dans une portion d'ADN (voir Transcription). L'ARN-polymérase bactérienne a une structure $\alpha_2\beta\beta'\sigma$, pour 450 kDa environ. Une sous-unité s a une fonction temporaire et sert de facteur d'amorçage ou facteur sigma. La sous-unité catalytique serait β. Les eucaryotes ont plusieurs polymérases, I, II et III, la II faisant surtout de l'ARN messager.

ARNr - ARN des ribosomes, servant de charpente à l'assemblage des protéines dans les particules, et jouant également un rôle capital dans la traduction : attachement au messager, mécanisme de traduction des gènes. Le grand conservatisme structural des ribosomes chez les êtres vivants se traduit par un plan d'organisation déterminé. L'ARN 16S des procaryotes, appartenant à la plus petite des sous-unités (particule 30S), a servi d'outil de comparaison pour retracer des généalogies évolutives et revoir parfois la taxonomie bactérienne. Opération étendue aux eucaryotes avec un ARN un peu plus long (ARN 18S).

ARNt - ARN de transfert.

Aromatique - Désigne une vaste famille de composés carbonés dont le benzène est un des plus simples. La structure du benzène a été déterminée pour la première fois en 1865 par KÉKULÉ VON STRAPONITZ (1829-1896). Les électrons π (pi) appartenant aux doubles liaisons sont entièrement délocalisés dans tout le cycle. Un composé aromatique comporte au moins un cycle insaturé avec 2 n + 4 électrons pi, n étant un nombre entier positif. La propriété s'applique à des hétérocycles (comportant des atomes d'azote ou de soufre). Dans le benzène : n = 1 ; dans le naphtalène avec 10 électrons pi, n = 3. Il existe d'autres critères pour caractériser l'aromaticité, fondée sur la symétrie ou l'énergie de résonance responsable de la stabilité des noyaux aromatiques. L'aromaticité confère une conformation rigide et s'accompagne de propriétés caractéristiques au point de vue substitution, addition, oxydoréduction. Par exemple un noyau aromatique réagit volontiers avec des composés électrophiles. Un substituant attracteur d'électrons diminue la densité électronique du cycle, comme dans le nitrobenzène. Il rend le noyau encore plus résistant à l'oxydation, tend à désactiver les attaques électrophiles et oriente les substitutions en *méta*. Un groupe donneur, soit parce qu'il exerce un champ répulsif (méthyle, alkyle), soit parce qu'il peut partager un doublet électronique avec le noyau (hydroxyle, amine, méthoxyle, halogène) a l'effet inverse et oriente les substitutions en *ortho* ou *para*. Par exemple le toluène est plus facile à oxyder que le benzène et le méthyle tend à orienter les attaques électrophiles en *ortho* et *para*.

Arséniate réductase - Réduit l'arséniate (AsO_4^{3-}) en arsénite (AsO_3^{3-}). L'enzyme a été décrite comme respiratoire en anaérobiose chez *Chrysiogenes arsenatis* : en croissance sur acétate (KRAFFT T & MACY JM (1998) *Eur. J. Biochem.* **255** : 647-653). L'enzyme est un hétérodimère renfermant Mo, au moins un noyau fer-soufre et Zn. Ne réduit pas le nitrate, le séléniate ou

le fumarate. On connaît aussi des arséniate réductases distinctes non respiratoires chez *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Arthrobacter - Gram-positifs aérobies non-sporulants importants dans la flore microbienne adaptée au sol, résistants à la dessication et au manque de nourriture, à physiologie très souple leur permettant de s'adapter à la dégradation des herbicides et pesticides. Ils se divisent sous une membrane commune enveloppant un chapelet de cellules. Sous l'effet de la croissance, cette membrane se déchire partiellement, mais persiste en faisant une charnière entre les cellules maintenues ensemble en formant un angle de l'une à l'autre (mode de division dit par cassure). En phase stationnaire, les cellules s'arrondissent sous forme coccoïde.

Ascorbate - Vitamine C, agent réducteur nécessaire au fonctionnement de diverses oxygénases. Sa synthèse à partir du glucose a disparu chez les Primates, d'où son rôle de vitamine. Il est indispensable chez les animaux à la formation d'hydroxyproline et d'hydroxylysine dans les procollagènes, et sa carence empêche la maturation normale du collagène (d'où le scorbut). L'ascorbate est abondant chez les plantes où il fonctionne notamment comme antioxydant dans la photosynthèse, en s'oxydant électron par électron en monodéhydroascorbate (radicalaire) et dihydroascorbate. Il intervient aussi dans le métabolisme des hormones végétales de croissance appelées gibbérellines. Les enzymes utilisant de l'ascorbate comme cofacteur ont souvent aussi du fer. On peut doser facilement la vitamine C par décoloration du dichlorophénol-indophénol.

Assimilation - Mécanisme destiné à produire des molécules ou des ions directement incorporables dans la matière vivante, tels que le phosphoglycérate (à partir de CO_2 dans le cycle de CALVIN), NH_3 (par réduction de nitrate ou de nitrite), ion sulfure (par réduction de sulfate), ...

Assimilation du nitrate (chez les plantes) **-** C'est globalement l'incorporation de l'azote du nitrate dans les molécules organiques, après une cascade de réductions qui fournit l'ammonium intermédiaire. Quelques repères :

- L'assimilation du nitrate prédomine dans les feuilles ou dans les racines selon les espèces. Le piégeage du nitrate par les racines est très efficace, utilise un transport actif.
- La vacuole est un lieu de stockage du nitrate en excès.
- La nitrate réductase est cytoplasmique, utilise NAD(P)H comme source d'électrons, contient FAD, un cytochrome b_{557}, et un cofacteur à Mo.
- La réduction du nitrite a lieu dans les plastes. L'enzyme (61 kDa dans l'épinard) utilise la ferrédoxine réduite comme donneur, contient une chaîne interne constituée d'un noyau [4Fe-4S], de FAD et d'un sirohème.
- L'azote ammoniacal est incorporé sous forme de glutamine puis de glutamate. Un système de navette couple la sortie du glutamate avec l'entrée de malate et d'oxoglutarate.
- Une transamination du glyoxylate (venant de la photorespiration) par le glutamate a lieu au niveau des peroxysomes.
- Le métabolisme de la glycine formée se poursuit dans la mitochondrie.

Atmosphère (Composition de l'air sec en gaz principaux) **-**

Constituant	Moles%	Demi-vie	Constituant	Moles%	Demi-vie
N_2	78,08		He	0,00052	
O_2	20,95		CH_4	0,00017	10 ans
Ar	0,93		Kr	0,00011	
CO_2	0,0356	50-200 ans	H_2	0,000053	
Ne	0,0018		N_2O	0,000031	150 ans

La vie moyenne est indiquée pour des constituants à effet de serre. Autres constituants : Xe, O_3, CO, SO_2, NO_2, NH_3. Le dioxyde de carbone augmente actuellement de 0,5% par an, celui du méthane de 0,9% par an (MACKENZIE FT & MACKENZIE JA (1995) *Our changing planet*,

Prentice-Hall : 288-307). L'atmosphère contient en outre de grandes quantités d'eau, variables (température, région, altitude), et des traces de constituants fabriqués par l'homme comme les CFC.

ATPase - Enzyme catalysant l'hydrolyse exergonique de l'ATP en ADP et phosphate, ou la réaction inverse par couplage avec une source d'énergie (notamment Δp dans le cas de l'ATPase F_oF_1). L'enzyme est alors une ATP synthase. Les ATPases sont de plusieurs sortes :

Catégorie	*Localisation*	*Exemple, fonction*
ATPases H (F_0F_1)	Bactéries, mitochondries et plastes	Pompes protoniques, synthases
ATPases A_0A_1	Archaebactéries	Comme F_0F_1
ATPases P	Eucaryotes	Pompes ioniques (Na, K, Ca…)
ATPases V	Vacuoles, endosome	Pompes protoniques

Les ATPases de type P forment une liaison covalente temporaire entre phosphate et enzyme. Une des plus connues est la pompe d'échange Na/K des eucaryotes. Les ATPases de type V sont des pompes à protons ($2H^+$ par ATP hydrolysé) qui acidifient certains compartiments cellulaires comme les vacuoles.

ATP synthase - Voir ATPase.

Autokinase - Protéine catalysant sa propre phosphorylation à l'aide d'ATP. Fait partie souvent d'un système régulateur à deux composants. Voir Régulations à deux composants.

Autotrophe - Organisme utilisant le CO_2 comme seule source de carbone (quelques facteurs de croissance exceptés). Certains auteurs étendent la définition à des germes qui se développent sur CO ou sur formiate, parce que ces composés sont alors oxydés en CO_2 qui reste la véritable porte d'entrée du carbone dans le métabolisme. Par contre les méthanotrophes et méthylotrophes utilisant des mono-carbonés réduits ne sont pas des autotrophes, car le CO_2 n'est pas la porte d'entrée du carbone ou ne l'est que partiellement.

Axénique (Culture) **-** Culture pure.

Azoïques - Composés organiques caractérisés par la liaison –N=N– .

Azoréductase - Enzyme réduisant le groupe nitro des colorants diazoïques en amine. Ce sont des nitroréductases, en particulier celles de classe II (voir Nitroréductases).

Azospirillum - Bactéries Gram-négatives flagellées de forme incurvée, fixatrices de N_2, remarquables par leur capacité de se développer au contact étroit des racines de diverses plantes, notamment de graminées tropicales (*A. lipofenum*) et du riz (*A. irakense*) dans une relation à caractère symbiotique où les bactéries stimulent la croissance de la plante par sa fixation de l'azote et l'apport d'hormones de croissance. La plupart des *Azospirillum* colonisent la surface des racines, l'attachement étant facilité par une glycoprotéine des flagelles. *A. diazotrophicus* est un endophyte avec d'autres espèces (*Azoarcus*, *Herbaspirillum*). L'assimilation de l'azote est sous la dépendance de NifA, un activateur transcriptionnel, inactif en excès d'azote et en présence de O_2, étudiée en détail chez *A. brasiliense*. Cette espèce a trois voies de synthèse de l'acide indole-3-acétique (une auxine), dont deux à partir du tryptophane et une atypique (STEENHOUDT O & VANDERLEYDEN J (2000) *FEMS Microbiol. Rev.* **24** : 487-506). Voir Rhizobactéries.

Azotobacter - Espèces Gram-négatives vivant librement dans le sol et fixatrices d'azote.

Azurine - Protéine bactérienne bleue monomérique de 14-16 kDa contenant un ion Cu^{2+} lié par une géométrie bipyramidale (deux pyramides triangulaires accolées par leur bases), avec Cys, 2 × His dans un même plan, Met et un cinquième ligand aux sommets. La structure est connue en détail chez *Pseudomonas fluorescens* où elle a 128 acides aminés, *Ps. aeruginosa* et *Alcaligenes xylosoxidans*. Absorbance à 625-630 nm (ε d'environ 7000 $M^{-1}.cm^{-1}$). Transporteur d'électron périplasmique, couplé éventuellement avec un cytochrome c. Le potentiel redox est dans la gamme des + 300 mV. L'azurine intervient notamment dans la réduction du nitrite en oxyde nitrique.

Bactérioferritine - Voir Ferritine.

Bactériorhodopsines - Protéines membranaires récepteurs à la lumière, présentes chez les halobactéries. Leur structure est similaire à celle de la rhodopsine de notre rétine et renferme du rétinal dont l'isomérisation commandée par la lumière déclenche le signal initial. *Halobacterium salinarum* a 4 bactériorhodopsines de 26 kDa, l'une d'elle agit comme pompe à protons et permet d'établir un potentiel membranaire utilisable pour la synthèse d'ATP. La seconde est une pompe à chlorure, les deux autres semblent être des récepteurs pour phototactisme.

Bactéroïdes - Bacilles Gram-négatifs courants dans l'environnement, anaérobies, chimio-hétérotrophes, produisent des acides organiques comme produits de fermentation. Ne réduisent pas les composés soufrés. Exemples : *Bacteroides*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*. Certains comme *B. succinogenes* et *B. ruminicola* ont un rôle majeur dans la flore du rumen, d'autres sont pathogènes. Dans la littérature, on a parfois désigné comme bactéroïdes les formes bactériennes altérées morphologiquement, rencontrées dans le genre *Rhizobium* et genres voisins, au cours de la symbiose dans les nodules de légumineuses.

Barreaux bêta - Font partie des structures dites secondaires dans les protéines. Quand la chaîne principale fait des va-et-vients dans la structure, elle peut établir latéralement sur elle-même des ponts hydrogène entre NH et O=C. Plusieurs barreaux forment ainsi des structures aplaties, dites feuillets bêta, rarement planes mais le plus souvent fortement vrillés (comme un panneau de bois qui aurait travaillé), formant parfois des structures cylindriques. Les barreaux bêta sont fréquents dans le coeur des protéines en définissant dans la molécule une zone rigide. Autres structures secondaires communes : les hélices alpha.

Bas-spin - Etat atteint par un atome métallique, comme le fer, lorsque sa géométrie de coordination est complète et régulière dans une situation dite de champ-ligand fort.

Basta - Glufosinate, herbicide analogue du glutamate, agit en inhibant la synthèse de glutamine. Rapidement biodégradable dans le sol.

Batch - (= lot). Une culture en batch est une culture discontinue en milieu liquide en fermenteur. Le liquide est ensemencé, incubé sans apport ultérieur de milieu frais, puis collecté avec les cellules. Dans une culture en batch alimenté, on renouvelle des éléments nutritifs en cours de croissance, et en batch répété, on remplace périodiquement une partie de la culture par du milieu frais.

Benzyl-viologène - Voir Viologènes.

Bêta-lactames - Famille de composés naturels contenant dans leur formule un cycle lactame précontraint à 4 atomes (un lactame est un amide interne à la molécule comme une lactone est un ester interne). Exemples : pénicilline, ampicilline. Les bêta-lactamases sont des amidases qui hydrolysent le cycle par un mécanisme similaire à celui des protéases à sérine.

Bêta-oxydation - Mécanisme classique d'oxydation des acides gras saturés en liaison thioester avec le coenzyme A, selon un principe potentiellement réversible, comportant :

- une déshydrogénation ;
- une hydratation de la liaison double ;
- une nouvelle déshydrogénation ;
- une rupture par thiolyse (réalisée par une molécule de coenzyme-A), conduisant à un acyl-CoA plus court de deux carbones et à l'acétyl-CoA.

C–SCoA O (1) C–SCoA O (2) C–SCoA O OH
(3)
C–SCoA O + C–SCoA O HSCoA (4) C–SCoA O O

Cette séquence d'évènements est probablement très ancienne dans l'histoire de la vie, et se retrouve sous forme camouflée (modifiée par l'évolution ?) dans d'autres métabolismes cellulaires. La séquence déshydrogénation, hydratation, déshydrogénation, réaction avec le coenzyme A, se voit aussi dans le cycle de KREBS.

Biocapteur - Dispositif fonctionnant à la manière d'une électrode, permettant le couplage entre un processus biologique (tel qu'une réaction enzymatique) et l'apparition d'un signal électrique lié spécifiquement à la présence d'un composé qu'il s'agit de détecter ou de doser.

Biofilm - Revêtement variable en épaisseur (de 1 à quelques dizaines de nm) formé à la surface des matériaux les plus divers par la multiplication de micro-organismes au sein d'une gangue de polysaccharides extracellulaires associés à des sels minéraux. Un biofim est une structure changeante au cours du temps. Plusieurs populations microbiennes peuvent s'y succéder en fonction des caractères physiques environnants. Des échanges de cellules et de composants macromoléculaires ont lieu avec le milieu ambiant. L'évaluation du nombre des bactéries peut se faire par mesure de la respiration cellulaire utilisant un sel de tetrazolium fluorescent, ou encore par microscopie quantitative après marquage de l'ADN avec un fluorochrome, le DAPI (4'-6-diaminidino-2-phénylindole) (RODRIGUEZ GG et coll. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 1801-1808).

Biogaz - Gaz produit par la dégradation anaérobie de la matière organique. Il comprend du méthane (50 à 65%), du gaz carbonique (35 à 40%) et d'autres gaz à l'état de traces (malodorants quand ils sont à la base de soufre et mercaptan). Il est générateur d'énergie, peut être utilisé de façon autonome ou couplé à une installation de gaz naturel.

Biolixiviation - Extraction d'éléments métalliques par solubilisation, réalisée surtout par des bactéries aérobies et acidophiles du genre *Thiobacillus*. Ces bactéries transforment le soufre des composés minéraux en acide sulfurique. *T. ferrooxydans* oxyde le fer ferreux en fer ferrique. Ce dernier en milieu acide peut oxyder l'uranium IV insoluble en uranium VI soluble. Dans le cas de minerai aurifère, la biolixivation permet d'extraire l'or en dégradant les gangues de pyrite.

Bioluminescence - Emission de lumière par un être vivant. L'énergie est généralement fournie par une réaction d'oxydation effectuée sur une luciférine. Dans la biofluorescence, l'émission lumineuse se fait par absorption d'une radiation incidente dans une gamme de longueurs d'onde déterminées plus courtes que celles de la lumière produite. La bioluminescence prélève une part non négligeable de l'énergie de la cellule émettrice et a souvent une fonction de reconnaissance ou de dissuasion (vibrions luminescents des poissons). Une enzyme bactérienne de réparation de l'ADN, la photolyase, a besoin de lumière pour fonctionner, et la bioluminescence peut y contribuer dans des cas particuliers.

Biomasse - Masse totale des cellules vivantes dans un milieu donné.

Biorémédiation - Emploi des micro-organismes pour la détoxification ou l'élimination de produits chimiques dont l'élimination de l'environnement est souhaitée.

Biosorption - Récupération de métaux dissous en utilisant les propriétés des parois cellulaires de champignons filamenteux ou autres organismes, qui piègent les cations métalliques tels que ceux de Cd, Ni, Pb, Zn, Ag, Cr, Ur.

Biotine - Vitamine H. Cofacteur des enzymes de tranfert des carboxyles, carboxylases et décarboxylases. La biotine proprement dite (encadrée) forme une liaison covalente avec une chaîne latérale de lysine dans la protéine.

Le long bras flexible permet un mouvement de la tête de la biotine du donneur vers l'acepteur (mouvement exagéré sur le dessin sous forme d'un retournement). La synthèse de la carboxybiotine à partie de CO_2 nécessite de l'ATP, avec formation intermédiaire d'un carboxyphosphate. La biotine est liée très fortement par des protéines (avidine du blanc d'œuf, streptavidine de *Streptococcus*). Des biotechnologies importantes reposent sur cette propriété.

BOD5 - Biochemical oxygen demand. C'est la quantité d'oxygène dissous (mg/L) consommé au bout de 5 jours à 20°C au cours de l'oxydation biologique des substances contenues dans un effluent.

Boîte (ou box) **-** Terme utilisé en génétique moléculaire, désigne une tranche d'ADN spécifiquement reconnue par une protéine.

Boues activées - Culture bactérienne libre brassée et oxygénée formée en bassin d'épuration, qui se rassemble en flocons ou "flocs" sous forme d'une sorte de boue. Les espèces bactériennes des boues sont pour 50% des Gram-négatifs (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*), des Gram-positifs comme *Kurthia*, *Micrococcus*. La plupart sont des hétérotrophes, mais il y a aussi quelques autotrophes (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*), des champignons (*Geotrichum*), des organismes filamenteux gênants pour les décantations quand ils prolifèrent excessivement : *Sphaerotilus*, *Thiothrix*...

BTEX (ou BTXE) **-** Sigle utilisé par les techniciens de l'environnement pour désigner un mélange de benzène, toluène, éthylbenzène et xylène, détecté dans les nappes aquifères et sédiments après contamination par des produits pétroliers abondants dans les carburants.

BTX - Voir BTEX.

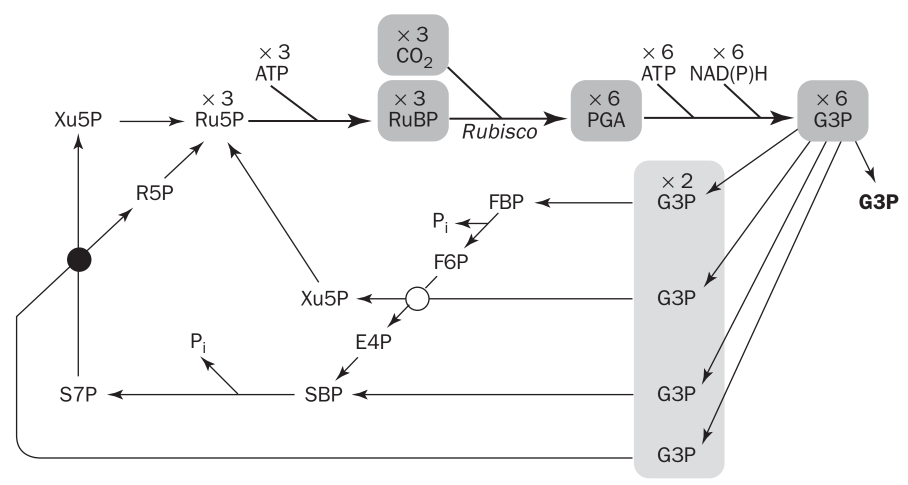
Cadre de lecture (ou phase de lecture) **-** Mode de traduction qui fait qu'un message est lu en codons de trois lettres selon un découpage déterminé, soit AGG UCA UUG CCU AGA et non pas en A GGU CAU UGC CUA GA... dont la signification est totalement étrangère à la première. Le choix initial ou mise en phase de la séquence à traduire part le plus souvent du codon d'amorçage AUG (méthionine, formyl-méthionine), soit ATG sur l'ADN.

Cadre de lecture ouvert - Souvent repéré par le sigle ORF. Il s'agit d'un gène présumé placé en aval d'un promoteur, parfois au sein d'un opéron (donc le promoteur peut être situé assez loin en amont), avec :

- un codon d'amorçage (ATG) ;
- une soixantaine de codons au moins dont le dernier est un codon non-sens ou Stop (TGA, TAG, TAA) ;
- une séquence d'attachement des ribosomes placée en amont du codon d'amorçage ; elle est appelée séquence de SHINE-DALGARNO chez les procaryotes, avec le consensus AAGGAGGT.

Le produit d'expression correspondant peut ne pas avoir été formellement identifié, mais sa nature peut se deviner parfois par suite d'une ressemblance de séquence avec des protéines connues.

CALVIN (Cycle de) - Appelé aussi cycle de CALVIN-BENSON. Cycle métabolique permettant l'assimilation du CO_2 par les plantes vertes (au niveau des chloroplastes), les algues, les cyanobactéries et diverses espèces bactériennes photosynthétiques ou non. Le cycle fonctionne sur un principe rappelant la voie des pentose-phosphates. Le premier produit caractéristique identifié par marquage est le 3-phosphoglycérate. L'identification dans un organisme de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco), de la ribulose 5-phosphate kinase (RPK) et de la sédoheptulose-1,7-bisphosphate phosphatase (SBPase) indique qu'il s'agit d'un autotrophe fonctionnant avec le cycle de CALVIN. Le coût énergétique de l'assimilation de chaque molécule de CO_2 par tour du cycle est de 3 ATP et de 2 NAD(P)H. Le cycle engendre des précurseurs essentiels pour les synthèses : l'érythrose-4-phosphate (E4P) vers le cycle aromatique, le ribose-5-phosphate (R5P) vers les acides nucléiques. Le sédoheptulose-7-phosphate (S7P) est aussi un intermédiaire caractéristique de la voie des pentose-phosphates.



E4P - Erythrose 4-phosphate
F6P - Fructose 6-phosphate
FBP - Fructose 1,6-bisphosphate
G3P - Glycéraldéhyde 3-phosphate
PGA - 3-Phosphoglycérate
R5P - Ribose 5-phosphate
Ru5P - Ribulose 5-phosphate
RuBP - Ribulose 1,5-bisphosphate
S7P - Sédoheptulose 7-phosphate
SBB - Sédoheptulose 1,7-bisphosphate
Xu5P - Ribulose 5-phosphate

(Le cercle noir indique la transcétolase et le cercle blanc la transaldolase)

CAP - *Catabolite activator protein*. Voir CRP.

Carbamyl-phosphate - $OC(NH_2)–O–PO_3^{2-}$. Intermédiaire important du métabolisme central, engendré à partir de HCO_3^-, NH_3 et ATP, intervenant notamment dans la synthèse du cycle des pyrimidines destinées aux acides nucléiques.

Carbonyle - Fonction C=O des aldéhydes et cétones.

Carboxydotrophe - Micro-organisme aérobie capable de se développer sur monoxyde de carbone. Il y a deux cas très différents. Chez les carboxydotrophes aérobies, l'oxydation de CO en CO_2 fournit à la fois de l'énergie et du carbone assimilable s'il s'agit d'un autotrophe. Chez un anaérobie acétogène, le CO est substrat de la CO déshydrogénase ou acétyl-CoA synthase.

Caroténoïdes - Pigments insolubles dans l'eau, de nature isoprénoïde (assemblage d'unités en C5 synthétisées à partir de l'acide mévalonique, qui est aussi à l'origine du cholestérol). Leur spectre d'absorption présente souvent une forme caractéristique à trois pics entre 400 et 520 nm, leur donnant une couleur rouge, orangé ou jaune. L'archétype est le carotène β, dont la structure contient deux cycles en C5 reliés par une chaîne hydrocarbonée insaturée. Sa scission et son oxydation sont à l'origine du rétinal. Les carotènes fonctionnent comme pigments accessoires de la photosynthèse, éventuellement capables de capter l'énergie lumineuse et de la transmettre à la chlorophylle antennaire, mais agissant surtout comme anti-oxydants et protecteurs contre l'oxygène singulet. La fucoxanthine est le caroténoïde brun conférant la couleur aux algues brunes et diatomées. Les bactéries non photosynthétiques et les champignons se chargent en caroténoïdes comme protection anti-solaire.

Catalase - Enzyme catalysant la destruction du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) : $2\,H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\,H_2O$. Les catalases sont généralement des enzymes héminiques ubiquistes dans les organismes aérobies, et interviennent notamment là où des oxydases produisent H_2O_2 (peroxysomes). Certaines catalases ne sont pas héminiques et contiennent du vanadium ou du manganèse.

CDP - *Cation diffusion facilitator*. Transporteur membranaire agissant par diffusion facilitée, c'est-à-dire rendant la membrane perméable à des cations déterminés appartenant à des

métaux lourds, participant à l'expulsion de l'excès de métal dans la cellule (PAULSEN IT & SAIER MJ (1997) *J. Membr. Biol* **156** : 99-103). Voir Diffusion facilitée.

Centre réactionnel - Désigne le complexe moléculaire de la photosynthèse où se fait la séparation de charges à partir de l'énergie lumineuse.

CFC - Chlorofluorocarbones. Exemples : fréons utisés autrefois dans les groupes frigorifiques.

Chaperonine - Chaperon moléculaire représenté typiquement par les HSP-60 ou le système GroELS *d'Escherichia coli*, une protéine du choc thermique intervenant dans la phase terminale de l'enroulement d'un polypeptide substrat ou comme agent de réparation des protéines dénaturées.

Chaperon moléculaire - Terme désignant une protéine capable de s'associer à une chaîne polypeptidique naissante ou partiellement déroulée (dénaturée), l'empêchant de s'associer à d'autres polypeptides. Les chaperons moléculaires favorisent l'enroulement correct des polypeptides, exercent leur action sur une vaste gamme de produits ou sur des substrats particuliers. Beaucoup sont des protéines du choc thermique, ont souvent un fonctionnement couplé à une hydrolyse d'ATP. Leur action peut s'exercer sur l'enroulement d'un grand nombre de polypeptides substrats, ou avoir au contraire une action plus limitée à certains composants qu'ils stabilisent. À la limite, un chaperon moléculaire spécifique d'un seul composant peut rester associé à lui et stabiliser par exemple son insertion dans la membrane.

Charge énergétique - C'est le rapport ([ATP] + 1/2 [ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP]). Le facteur 1/2 est affecté à [ADP], parce qu'une enzyme très répandue, l'adénylate kinase, catalyse la réaction réversible ATP + AMP $\leftrightarrow$ 2 ADP (en présence de Mg).

Chémostat - Culture continue faite à volume constant, où le milieu frais est apporté en continu, ainsi que le prélèvement du milieu de culture. Le chémostat est généralement utilisé en présence d'un facteur limitant, comme l'apport d'un élément nutritif. Il s'établit un état stationnaire, équilibre dynamique où la concentration cellulaire et la composition du milieu restent constants au cours du temps, aussi longtemps que cette situation fragile n'est pas rompue par l'apparition de mutants ou par un léger changement des conditions. Voir aussi Turbidostat.

Chimio-lithotrophe - Organisme tirant son énergie de l'oxydation d'un composé minéral : H_2, NH_3, S^{2-}, $S_2O_4^{2-}$, Fe^{2+}... L'accepteur d'électrons est O_2, ou encore le nitrate. Exemples répandus : les bactéries du genre *Thiobacillus*, qui oxydent les sulfures jusqu'au stade sulfate. Les chimio-lithotrophes facultatifs peuvent aussi tirer leur énergie de l'oxydation d'un substrat organique. Les chimio-litho-autotrophes utilisent CO_2 comme seule source carbonée.

Chimiotactisme - Mécanisme permettant d'orienter le développement d'un organisme ou ses déplacements sous l'influence de signaux chimiques, agissant par la présence ou l'absence d'un produit ou les variations de sa concentration.

Chiralité - Propriété qui fait qu'un objet n'est pas superposable à son image dans un miroir, comme la main gauche et la main droite.

Chloroperoxydase - Glycoprotéine extracellulaire d'origine fongique étudiée chez *Caldariomyces fumago*, possédant une gamme étendue d'activités catalytiques qui la rapproche des peroxydases, catalases et cytochromes P450. Elle peut halogéner par chlorure, bromure ou iodure des molécules organiques diverses. La cystéine est le cinquième ligand du fer comme dans un P450.

Chlorosomes - Structures membranaires particulières aux bactéries vertes sulfureuses, disposées en tubules accolés à la face interne de la membrane cytoplasmique et contenant les pigments sensibles à la lumière (bactériochlorophylles a, c, d et e).

Choc thermique - Brusque changement de température susceptible de modifier la structure de certains constituants cellulaires ou de perturber les régulations. Chez *E. coli*, l'exposition temporaire à une température supérieure à 42°C.

Cinnamique (Acide) **-** Acide phényl-3-propénoïque.

CO déshydrogénase - Catalyse l'oxydation de CO en CO_2. Il y en a deux sortes très différentes :

- Chez les acétogènes et méthanogènes, la CO déshydrogénase catalyse réversiblement la scission de l'acétyl-CoA et peut s'appeler acétyl-CoA synthase. L'enzyme contient des noyaux fer-soufre, du nickel, et se montre très sensible à O_2.
- Chez les bactéries carboxydotrophes aérobies et les pourpres non sulfureuses, oxydent uniquement CO en CO_2. C'est une enzyme *flavinique* complètement étrangère à la précédente.

Cobalamines - Voir Corrinoïdes.

Cobalt - Métal de transition, pouvant osciller entre trois niveaux redox Co(I), Co(II) et Co(III). Sa fonction physiologique essentielle est sa participation dans la vitamine B12 et les corrinoïdes. Les sels de Co(II) changent de couleur avec la température et l'activité de l'eau, passant de la géométrie de coordination octaédrique (rose) à une géométrie tétraédrique (bleu).

Cobamides - Voir Corrinoïdes.

COD - *Chemical oxygen demand*.

CODH - Monoxyde de carbone déshydrogénase. Voir CO déshydrogénase.

Codon - Succession sur le brin signifiant de l'ADN de trois bases successives représentant un acide aminé ou un signal de fin dans le tableau du code génétique. Ces codons se retrouvent sur l'ARN messager après transcription, l'uracile étant à la place de la thymine. Le tableau du code génétique, pratiquement universel et reproduit dans tous les manuels, montre que certains acides aminés sont déterminés par plusieurs codons. Le tableau est dit dégénéré (du mot anglais *degenerate*). Dans leur traduction les espèces vivantes ont généralement une préférence pour certains codons. La fréquence particulière de certains codons pour d'autres de même signification est caractéristique ("codon bias") et se retrouve entre espèces apparentées. C'est donc un outil utilisé dans les comparaisons de séquences.

Coenzyme A (CoA) **-** Ce cofacteur se lie par la fonction thiol portée à son extrémité avec les fonctions carboxyliques, avec perte d'une molécule d'eau, en formant un thioester. L'acide ainsi lié au coenzyme A est sous forme acyle dite activée, lui permettant d'être transféré tel quel à un autre accepteur ou de subir une modification, par exemple une réduction. Le coenzyme A et sa fonction thiol est souvent désigné en abrégé par HS-CoA. Il est assemblé par petits morceaux :

HS–CH_2–CH_2–NH–C(=O)–CH_2–CH_2–NH–C(=O)–CH(OH)–C(CH_3)$_2$–CH_2–O–P(=O)(O^-)–O–P(=O)(O^-)–O–adénosine 3',5'-phosphate

cystéamine | acide pantothénique | adénosine 3',5'-phosphate

panthéthéine 4'-phosphate

cystéine → cystéamine + CO_2

L'acide pantothénique a pour précurseurs la β-alanine et la valine. C'est une vitamine du groupe B (les cellules humaines ne peuvent pas l'assembler), très répandu dans le monde vivant, mais exigé ici et là (facteur de croissance) par certaines espèces bactériennes (*Proteus morganii*). La liaison thioester entre le coenzyme A et un acide carboxylique est une réaction endergonique qui nécessite l'hydrolyse de l'ATP en AMP et pyrophosphate (voir Ligase).

Coenzyme B - 7-mercaptoéthanoylthréonine-phosphate, désigné aussi par HS-HTP. Cofacteur de la méthanogénèse dans la réduction du méthylcoenzyme M.

Coliformes - Bactéries Gram-négatives non sporulantes capables de fermenter le lactose en formant du gaz au bout de 48 h à 35°C. Les plus courantes sont *Escherichia coli*, *Enterobacter* et espèces voisines. Souvent utilisées comme indice d'une contamination fécale de l'eau.

Colicines - Protéines antibiotiques (bactériocines) codées par plasmide et produites par les coliformes contre d'autres bactéries. Les colicines se fixent à la surface des bactéries sensibles à l'aide de récepteurs. Elles peuvent provoquer la lyse ou attaquer des sites intracellulaires comme les ribosomes.

Coliphage - Bactériophage utilisant *Escherichia coli* pour hôte.

Cométabolisme - Dégradation d'un composé inhabituel par un organisme, qui ne peut pas s'en servir comme seul support de croissance mais doit utiliser une autre substance comme source de carbone et d'énergie. Le cométabolisme concerne souvent un substrat qui présente des similitudes avec le substrat de croissance, reconnu par les mêmes enzymes quand la spécificité de ces catalyseurs est suffisamment élastique. Un cométabolisme peut s'interrompre à un stade intermédiaire et accumuler un produit qui n'est pas transformé plus avant.

Commensalisme - Association de deux organismes où l'un d'eux tire un bénéfice de la situation tandis que l'autre n'en est pas affecté.

Compétence - Voir Transformation.

Complexant des métaux - Composé organique formant un complexe de coordination avec un ion métallique, qui est séquestré. Les métaux de transition (Fe, Co, Ni) se combinent volontiers avec un atome d'azote ou d'oxygène, moins souvent avec le soufre. Zn et Hg se combinent souvent avec le soufre, les alcalins et alcalino-terreux (Mg, Ca, Mn) souvent avec des oxy-anions (aspartate, glutamate dans les protéines).

Consensus - Portion de séquence montrant des caractères constants au cours des comparaisons de séquence. Dans le cas des protéines, traduit un conservatisme structural entre protéines homologues, accompagne généralement une fonction déterminée. Dans un acide nucléique, un consensus est typiquement un motif reconnu par une protéine régulatrice, les ribosomes…

Consortium - Terme utilisé surtout dans les textes anglo-saxons. Cohabitation de plusieurs organismes présentant entre eux une association fonctionnelle. Par exemple une espèce A fournit un facteur de croissance à l'espèce B, celle-ci élimine un inhibiteur défavorable à la multiplication de A. S'applique le plus souvent à des espèces bactériennes ou fongiques.

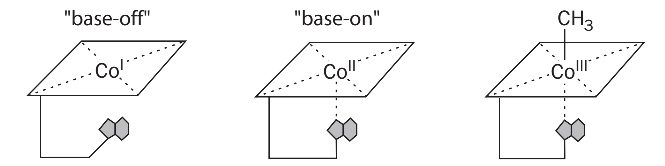
Convergence évolutive - Résultat d'une évolution où la sélection naturelle a imposé un type de structure ou une morphologie adaptée à la fonction. Par exemple, requins et dauphins.

Coopérativité - Phénomène concernant la liaison d'un ligand sur une protéine ou un acide nucléique, quand elle facilite (coopérativité positive) ou entrave (coopérativité négative) la fixation d'une deuxième molécule identique. La coopérativité peut jouer sur un nombre plus ou moins important de molécules de ligand et se traduit par une constante d'affinité variable en fonction du nombre de molécules en place.

Coproporphyrine III - Intermédiaire de synthèse de la protoporphyrine IX, qui avec du fer donne l'hème. La transformation remplace deux chaînes propionyle en groupes vinyle.

Corrinoïdes - Cofacteurs renfermant un noyau rappelant la structure des porphyrines et contenant du cobalt. On les appelle aussi cobamides ou cobalamines. Les représentants les plus connus de cette famille ubiquiste, dont il existe une assez grande variété chez les archaebactéries, est la vitamine B12, dont la formule apparaît dans les manuels de biochimie, et la 5'-désoxyadénosyl-cobalamine. Le métal est Co(I), Co(II) ou Co(III), placé au centre d'un noyau chimique rappelant celui des porphyrines. L'état Co(III) permet l'établissement d'une liaison organométallique entre le cobalt et un atome de carbone. Le cobalt est alors hexacoordonné (*base-on*), parce que du côté opposé au plan du noyau

s'établit une sixième liaison avec un noyau azoté benzimidazole ou analogue. Par réduction à Co(I), cette liaison est rompue, le cobalt est alors tétracoordonné (*base-off*), comme symbolisé par un schéma trivial où le plan de la pseudo-porphyrine est indiqué par un carré.



L'établissement de la liaison Co–C, notamment par l'apport d'un méthyle, se fait donc par une oxydoréduction interne et un changement de conformation du cofacteur, qui stabilisent cette liaison. L'opération inverse la rend labile. Les propriétés de Co dans les corrinoïdes permettent à ces cofacteurs d'intervenir dans des réactions radicalaires, des transpositions, des transferts de méthyle (comme dans la formation du méthylmercure), de participer à des métabolismes variés dans une grande partie du monde vivant, et de nombreux micro-organismes font une synthèse de corrinoïde. Cette versatilité des corrinoïdes au niveau du centre métallique leur permet de fonctionner à la manière d'un réactif de GRIGNARD (anionique), d'un agent radicalaire ou d'un réactif de MEERWEIN (cationique).

COT - Carbone organique total, mesuré dans les eaux usées par calcination d'un micro-échantillon et mesure du CO_2.

Crénarchaeotes - Groupe d'archaebactéries considérées comme proches des formes de vie les plus primitives, contenant des thermophiles extrêmes vivant en milieu très acide et diverses formes planctoniques. *Pyrolobus fumaris* peut vivre jusqu'à 113°C. Le génome de *Aeropyrum pernix* a été complètement séquencé. Appartiennent à ce groupe : *Sulfolobus*, *Pyrodictium*, *Acidianus*, *Thermosphaera* et d'autres.

Crésols - *ortho*-, *méta*- et *para*-hydroxytoluène (ou méthyl-phénols). Les deux derniers sont abondants dans le goudron de houille, libérés par pyrolyse du bois. Ils sont présents dans le créosote. Les chauffages domestiques, moteurs à combustion, ainsi que l'abrasion de l'asphalte des routes en libèrent de grandes quantités dans l'environnement. Peu solubles, ils peuvent se déposer au fond des eaux et leur libération progressive engendre des effets très toxiques pour la faune aquatique à raison de 10-20 mg/L en moyenne. Les doses létales sont de l'ordre de 40 mg/L pour les algues vertes, et seulement de 7 mg/L pour les cyanobactéries. Ils peuvent s'accumuler dans les sédiments par adsorption sur l'argile, mais les plantes sont capables de les absorber et de les éliminer progressivement.

Créosote - Goudron huileux, brunâtre et odorant provenant du bois ou du goudron de houille après distillation. C'est un mélange complexe et mal défini, insoluble dans l'eau mais possédant des constituants volatils conférant une odeur forte. À partir du bois, on trouve surtout du phénol, des crésols, du gaïacol. À partir de la houille sont présents de très nombreux produits dont des hydrocarbures aromatiques polycycliques plus ou moins fortement oxygénés. Utilisé comme agent protecteur du bois contre les champignons (traverses, poteaux télégraphiques). Utilisé accessoirement pour la protection des collections d'insectes et conférant alors avec le formol une odeur caractéristique dans les laboratoires de Zoologie!

CRP - *Cyclic AMP receptor protein*. Appelée aussi CAP. En liant l'AMP cyclique, la protéine chez *E. coli* se lie à l'ADN et active la transcription des gènes de l'opéron Lactose, ainsi que celle de divers opérons commandant généralement des fonctions cataboliques. L'induction de la β-galactosidase (LacZ) se produit donc à deux conditions : levée du blocage exercé par le répresseur spécifique par fixation de l'inducteur (qui agit comme effecteur allostérique, voir Allostérie), et liaison de CRP sur l'ADN en un site adjacent, lui permettant d'intergir avec l'ARN-polymérase. La répression catabolique, exercée par exemple sur un milieu glucosé, est due à un taux d'AMP cyclique insuffisant pour l'attachement de CRP sur l'ADN. Par contre une élévation de l'AMP cyclique, un signal pour la mobilisation des ressources énergétiques, déclenche l'action favorable de CRP comme activateur de l'induction des gènes *lac*.

Cuivre - Oligo-élément essentiel introduit dans diverses enzymes d'oxydoréduction ayant pour substrat O_2, du superoxyde, des oxydes d'azote, de l'ascorbate, des phénols et autres :
- des oxydases (les plus nombreuses) opérant spécifiquement sur des substrats variés (galactose, amines, catéchol, ascorbate, cytochrome c dans la chaîne respiratoire...) ;
- des mono-oxygénases (phénols, peptidyl-glycine, tyrosine, dopamine,..) ;
- des dioxygénases (indole, quercétine...) ;
- des réductases (nitrite, oxyde nitreux) ;
- les superoxyde dismutases à cuivre et à zinc.

Le cuivre fonctionne entre les états Cu(I) et Cu(II). Il figure également dans des transporteurs d'électrons (azurine, plastocyanine) ou d'oxygène (hémocyanines animales). Il est véhiculé dans notre plasma par la céruloplasmine, qui est une ferro-oxydase transformant Fe(II) en Fe(III). Le cuivre est indispensable à la marche de la photosynthèse et à la synthèse de la chlorophylle. Le cuivre dans les protéines se rencontre dans plusieurs environnements moléculaires, identifiés par le spectre et la RPE. Les types I et II n'ont rien à voir avec le degré d'oxydation. Dans le type I (bleu), le cuivre est coordonné à 5 sites dont 4 acides aminés, soit 2 H, S, M (azurine, plastocyanine), ou 2 H, S, E (phytocyanine), ou encore 2 H, S, H_2O dans la céruloplasmine. Les oxydases "bleues" comme l'ascorbate oxydase contiennent un Cu de type I. Dans le type II, le cuivre est également pentacoordonné avec des atomes d'azote, de soufre ou d'oxygène, en général par plusieurs histidines. Le cuivre adoptant cette structure se trouve dans certains superoxyde dismutases, l'amine oxydase et diverses oxydases, des oxygénases dont la méthane oxygénase, la nitrite réductase. Dans le type III, il y a deux ions Cu pontés par de l'oxygène et formant un noyau bimétallique silencieux en RPE. Dans la N_2O réductase, les deux ions Cu sont pontés par du soufre. Un environnement particulier autour du cuivre s'observe dans la cytochrome c oxydase et les quinol oxydases.

Cuprédoxine - Protéine transporteur d'électrons fonctionnant à l'aide d'ions cuivre.

Cyanate - $N{=}C{=}O^-$ (correspond à N=C=OH). C'est un nucléophile agissant sur deux poles, O ou N, pouvant donner théoriquement les deux réactions sur un réactif RX : N=C=O–R (cyanate ou alkylcyanate) ou R–N=C=O (dérivé isocyanate). La réaction est généralement régiospécifique et ne forme que l'isocyanate. Dans le cas du thiocyanate ou S remplace O ($N{=}C{=}S^-$), les deux solutions coexistent, et il y a formation de dérivé thiocyanate N=C=S–R, bien que le dérivé thioisocyanate R–N=C=S soit généralement le produit majoritaire. La mesure du cyanate consiste à estimer l'ammonium formé après traitement à pH acide et ébullition, ou encore par une réaction colorée avec l'acide anthranilique (DORR & KNOWLES (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* **60** : 289). Le thiocyanate est mesuré par colorimétrie comme cyanate ferrique.

Cyanobactéries - Procaryotes photosynthétiques, appelés autrefois algues bleu-vert. Renferment de la chlorophylle a, à l'exclusion de la chlorophylle b, qui est remplacée par des pigments spéciaux similaires à la bilirubine et appelés phycobilines. Pigments fixés par des liaisons covalentes à des complexes protéiques appelés phycobilisomes contribuant à capter la lumière pour le PS2. Photosynthèse pratiquée sur le mode de celui des chloroplastes, fait la photolyse de l'eau et libère O_2. Monocellulaires ou pluricellulaires, souvent filamenteuses. On y observe des différenciations cellulaires et plusieurs formes de propagation. Certaines espèces assimilent l'azote atmosphérique. Réserves carbonées particulières (voir Cyanophycines). Les cyanobactéries se rencontrent dans tous les biotopes, souvent aptes à coloniser des milieux difficiles, et ont existé aux temps les plus anciens dont nous avons conservé des traces de vie (voir Stromatolites). Peuvent donner lieu à des proliférations importantes dans les eaux, résistent assez bien à des conditions alcalines, et sécrètent des substances toxiques pour les autres espèces, voire pour l'homme (voir Microcystine). Tendance fréquente à s'associer avec d'autres organismes, par exemple *Azolla* dans les fougères aquatiques. Symbiotiques dans de nombreuses espèces de lichens (en particulier des *Nostoc*). On admet généralement que les chloroplastes dérivent d'anciens organismes endosymbiotiques apparentés aux cyanobactéries actuelles. Quelques exemples sont donnés dans un tableau.

Morphologie	Reproduction	Exemples
Unicellulaires ou coloniales	fission binaire	*Gloebacter, Microcystis, Synechocystis, Chroococcus*
Unicellulaires ou coloniales	bourgeonnement	*Dermocarpa, Chamaesiphon, Xenococcus*
Filamenteuses	trichomes (chaînes de cellules)	*Oscillatoria, Spirulina, Phormidium, Schizothrix*
Filamenteuses à hétérocystes	fragmentation de trichomes	*Nostoc, Anabaena, Calothrix, Cylindrospernum, Scytonema*
Filamenteuses ramifiées	fragmentation de trichomes	*Stigonema, Chlorogleopsis*

Cyanophycines - Réserve carbonée et azotée des cyanobactéries, faite de polymères d'acide aspartique dont chaque unité est liée à l'arginine.

Cycle de CALVIN - Voir CALVIN.

Cyclodextrines - Molécules cycliques (macrocycles) naturelles constituées de six à dix unités de *D*-glucose, obtenues par transformation microbiologique ou enzymatique de l'amidon. L'enchaînement constituant les cyclodextrines délimite une cavité rigide pour les plus simples, apolaire et chirale, dont la dimension varie en fonction du nombre d'unités. La caractéristique la plus importante des cyclodextrines est leur capacité à inclure dans leur cavité une variété de substances solides, liquides ou gazeuses conduisant à la formation de supermolécules.

Cyclosérine (*D*-) **-** Antibiotique tiré à l'origine d'un *Streptomyces*, utilisé dans le traitement de la tuberculose, agirait comme analogue de la *D*-alanine et inhibe la synthèse d'une paroi normale de peptidoglycanes.

CysB - Protéine régulatrice commandant le régulon d'assimilation des composés soufrés par les bactéries (à la manière de PhoR pour le phosphate).

Cytochrome - Protéine héminique, c'est-à-dire renfermant un ou plusieurs hèmes, fonctionnant comme transporteurs d'électrons. Les chaînes respiratoires comportent habituellement un ou plusieurs cytochromes. Une activité enzymatique se rencontre dans des cytochromes particuliers (P450, nitrite réductase). Bien qu'il existe des cytochromes solubles, beaucoup sont insérés dans une membrane et fonctionnent éventuellement en couplant une translocation unidirectionnelle de protons avec le passage des électrons. La nomenclature est fondée sur la bande dite alpha du spectre d'absorption du cytochrome réduit. Les cytochromes b ont une bande alpha comprise entre 555 et 565 nm, et contiennent un hème B. Dans les cytochromes c (bande au-dessous de 555 nm), il y a un ou plusieurs hèmes B liés à la protéine par liaisons covalentes. Les cytochromes a ont une bande vers 590 nm et contiennent au moins un hème A. Les cytochromes o ont un hème O (hème A modifié). Les cytochromes sont souvent désignés par leur bande alpha (par exemple cytochrome b_{558}), plus rarement par la valeur de leur potentiel redox. Voir Hème.

Cytochrome b_5 - Cytochrome de faible masse moléculaire planté dans les membranes internes des cellules eucaryotiques, et participant au fonctionnement de mono-oxygénases. Bien connu dans les cellules du foie animal où il est ancré aux membranes du réticulum endoplasmique.

Cytochrome c - Cytochrome contenant un ou plusieurs hèmes C (voir Hème, Cytochrome), la porphyrine étant attachée au polypeptide par des liens thio-éthers. Les cytochromes c sont typiquement extracytoplasmiques, c'est-à-dire dans le périplasme des Gram-négatifs ou associés à la membrane du côté périplasmique. Dans les mitochondries, ils sont localisés à l'extérieur de la membrane interne. On reconnaît plusieurs classes de cytochromes c sur la base de propriétés structurales, se traduisant par des gammes de potentiels différents. Dans la classe I, où sont les cytochromes mitochondriaux solubles, les ligands sont His et Met, celui-ci étant près du C-terminal. Le cytochrome c mitochondial de source animale,

vendu commercialement, est un accepteur d'un électron (la réduction s'accompagne d'un changement de spectre), utilisé comme réactif commode dans les tests, en particulier avec les réductases flaviniques comportant un centre fer-soufre. Dans la classe II, il y a un ou plusieurs hèmes, le fer étant souvent pentacoordonné ; un exemple est le cytochrome c' de *Chromatium vinosum*. Ils lient CO, NO, CN^-. Dans la classe III, ce sont généralement des cytochromes à bas potentiel, à plusieurs hèmes, comme le cytochrome c_3, les coordinants du fer étant deux His. La classe IV regroupe des cytochromes ayant des hèmes et d'autres groupements, comme une flavine dans les flavocytochromes. On y rassemble diverses protéines comme l'hydroxylamine réductase, le c_{554} de *Nitrosomonas*…

Cytochrome P450 - Voir P450.

Dam (*D-adenine methylation*) **-** Méthylation de l'ADN bactérien par une méthylase codée par le gène *dam*, exercée sur les deux brins d'ADN sur la séquence (identiques dans les deux sens) qui est GATC. Permet aux mécanismes de réparation de l'ADN de distinguer le brin parental du brin nouveau au cours de la réplication, celui-ci n'étant méthylé à son tour qu'après un délai. Le brin nouveau est donc sélectionné pour la réparation des erreurs d'appariement (*mismatch*). Les bactéries dam^- sont viables mais présentent un taux accru de mutations. Les sites *dam* sont nombreux et dispersés dans le génome bactérien.

DAPI - 4',6-diamidino-2-phénylindole. Colorant d'intercalation des acides nucléiques bicaténaires, fluorescent, pouvant servir à repérer les hybrides. Par exemple en faisant une hybridation avec une sonde appropriée sur l'ARN ribosomique dans des cellules préalablement fixées, on peut faire une numération des cellules totales ou des cellules d'une espèce déterminée (en fonction de la sonde). On peut voir une application à des aquifères contaminés dans HESS A *et al.* (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 2136-2141.

DBMIB - 2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone. Poison de la photo-synthèse oxygénique, intervenant au niveau de l'oxydation du plastoquinol.

DBO - Demande biologique en oxygène. Sa détermination consiste à mesurer la quantité totale de O_2 consommée au cours de l'oxydation des matières organiques dans un échantillon donné. La **DBO5** est mesurée au bout de 5 jours. Des appareils automatisés tels que le Micro-Oxymax (Columbus) permettent de mesurer la DBO5 ainsi que la production de CO_2. Ces mesures sont souvent utilisées pour vérifier le caractère biodégradable d'un composé. Elles permettent aussi d'avoir une idée de la contamination organique globale d'un effluant, moyennant certaines corrections, notamment lorsqu'il y a des nitrates. Une eau potable doit avoir une DBO5 pratiquement nulle. Les eaux usées urbaines ont une DBO5 pouvant varier de 150 à 350 mL/L. Des valeurs bien plus élevées sont enregistrées à la sortie des laiteries, abattoirs, et surtout des distilleries (vinasses), parfois plus de 30 000 mg/L. Voir aussi COT , DCO.

DCCD - Dicyclohexylcarbodiimide, peu soluble, découplant à concentration faible (1 µM).

DCIP - Dichlorophénol-indophénol. Colorant accepteur de deux électrons, décoloré en $DCIPH_2$. Test d'absorbance à 600 nm ($\varepsilon = 22\,000\ M^{-1}\,cm^{-1}$). Commode pour le dosage de nombreuses oxydoréductions, en particulier celle des réductases flaviniques. La réaction très rapide permet le dosage des oxydases, même en présence de O_2. Le DCIP réduit ne se réoxyde que lentement à l'air, mais le fait très rapidement en présence d'ions Mn^{2+} ou de superoxyde dismutase (cause d'artefacts). Le DCIP est souvent utilisé en mélange avec le PMS.

DCMU - 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée. Bloque la photosynthèse au niveau du PS2, en empêchant le transfert d'électron après Q_A.

DCO - Demande chimique en oxygène des eaux usées, obtenue à l'aide d'un agent oxydant puissant comme $K_2Cr_2O_7$. Evaluée en kg dans les eaux industrielles.

Déazaflavines - Analogues des flavines ou une position azotée (N^{10}) intervenant dans l'oxydo-réduction est remplacée par le carbone. Le nouveau coenzyme ne peut alors plus faire d'échanges électron par électron, mais par 2 électrons à la fois comme le NAD^+. Utilisé expérimentalement pour élucider le mécanisme réactionnel. Le F420 est une dézaflavine naturelle.

Décarboxylation - Perte d'une fonction carboxylate ($–COO^-$) sous forme de CO_2.

Découplant - Agent inhibant la synthèse d'ATP à partir du potentiel membranaire ou l'opération inverse. Il y a deux sortes de découplants, ceux qui rendent la membrane perméable aux protons ou aux ions, ceux qui entravent le fonctionnement de l'ATPase/ATPsynthase.

Dénitrification - Réduction de l'ion nitrate en milieu anaérobie dans l'environnement. La dénitrification *sensu stricto* est un mécanisme énergétique où le nitrate est réduit en nitrite, puis en N_2O et N_2. Une autre voie est la dissimilation réductrice du nitrate en ammoniac appelée aussi ammonification dissimilatrice. Dans les deux cas l'ion nitrite est une étape intermédiaire de la réduction du nitrate. Une réductase convertit l'oxyde nitreux en azote. Elle est inhibée par l'acétylène, et la détection de N_2O qui en est facilitée, est un bon indice de dénitrification. La dissimilation du nitrate entraîne dans tous les cas une consommation de nitrate bien supérieure à celle qui est requise pour approvisionner la cellule en azote, c'est-à-dire l'assimilation. La réduction du nitrate s'accompagne d'un fractionnement isotopique suffisant pour qu'on puisse faire la part de la dénitrification et de l'ammonification : au fur et à mesure qu'il est consommé, le nitrate restant s'enrichit légèrement en azote-15, alors que le rapport $^{15}N/^{14}N$ s'abaisse dans les produits formés.

Désacylation - Enlèvement d'un acyle, soit par hydrolyse libérant l'acide carboxylique correspondant, soit par un transfert portant le fragment acyle sur un accepteur.

Désaturase - Crée une double liaison dans la chaîne carbonée d'un acide gras. Opère à la façon d'une mono-oxygénase : hydroxylation, puis élimination d'une molécule d'eau. Dans l'enzyme du ricin le site catalytique comporte un noyau Fe-O-Fe, les substrats sont l'oléyl-ACP (voir ACP), le NADPH et O_2. La longueur de chaîne optimale est celle de l'ACP-18 : 0. Dans le foie de l'homme les électrons sont transportés du NADH à l'oxygénase par une réductase et le cytochrome b_5.

Déshalogénase - Enlève un atome d'halogène sous forme d'ion halogénure. Les déshalogénases hydrolytiques remplacent l'halogène par un hydroxyle provenant d'une molécule d'eau.

Déshydrogénases - Enzyme catalysant une déshydrogénation, en utilisant un coenzyme (pouvant se comporter comme deuxième substrat quand il n'est pas lié de façon covalente à la protéine), du type NAD^+, $NADP^+$, flavine (FAD, FMN), PQQ et autres. On a coutume de nommer l'enzyme en lui donnant le nom du substrat principal dans le sens de l'oxydation, même lorsque la réaction observée s'observe en sens inverse.

Déshydrogénation - Réaction d'oxydation comportant le prélèvement simultané d'un ou de deux atomes d'hydrogène sur le substrat. Dans le cas du NAD comme accepteur, le modèle est : AH_2 (substrat) + $NAD^+ \rightarrow A + NADH + H^+$. L'hydrogène est alors enlevé sous forme d'un ion hydrure et d'un proton, et l'oxydation est à deux électrons. Un coenzyme nicotinique tel que le NAD^+ est généralement lié de façon non covalente et reste facilement échangeable sauf quand l'affinité est très forte dans les enzymes appelées maintenant nicotinoprotéines. Dans le cas de FAD, le modèle est : $AH_2 + FAD \rightarrow A + FADH_2$. L'oxydation à l'aide des flavines peut se faire à deux électrons, ou électron par électron, avec formation intermédiaire de radicaux (voir Flavines). Les déshydrogénations sont potentiellement réversibles, en fonction des concentrations des entités en présence et des potentiels d'oxydoréduction. Le modèle de certaines déshydrogénations est plus complexe, peut comporter une décarboxylation ou d'autres opérations, et mettre en jeu des cofacteurs supplémentaires liés à l'enzyme : hèmes, noyaux fer-soufre…

Désulforédoxine - Protéine transporteur d'électrons de très petite taille (2×36 acides aminés) chez *Desulfovibrio gigas*, de type rubrédoxine. Le fer est substituable par d'autres métaux. Excellent modèle pour étudier les rapports polypeptide-métal dans les métalloprotéines (ARCHER M et coll. (1999) *Protein Sci.* **8** : 1536-1545).

Désulfoviridine - Sulfite réductase dissimilatrice de *Desulfovibrio vulgaris* (WOLFE BM & COWAN JA (1994) *Eur. J. Biochem.* **223** : 79-89).

DHAP - Dihydroxyacétone-phosphate.

Diagénèse - Ensemble des processus qui transforment progressivement un sédiment en roche sédimentaire. Commence par l'action des êtres vivants, se poursuit avec le temps par

compaction et perte d'eau, réactions chimiques, migration de certains éléments, remplacement de certaines formes minérales par d'autre (calcite en aragonite, opale en calcédoine…).

Diauxie - Présence de deux phases de croissance observées parfois dans des cultures où il y a deux substrats carbonés. L'un des deux est utilisé prioritairement jusqu'à épuisement avant que l'utilisation du second prenne le relais. Ce phénomène est fréquent dans les biodégradations. Il a pour effet de freiner l'utilisation d'un polluant ou d'un xénobiotique par une population bactérienne aussi longtemps qu'un substrat de croissance plus favorable (glucose, acide aminé…) n'a pas été presque totalement consommé. Voir Répression catabolique.

Diazoïque - Formé par diazotation avec une amine aromatique et un nitrite en milieu acide. Les diazoïques réagissent avec des phénols et amines pour donner des produits colorés. Cette chimie a une énorme importance dans l'industrie des colorants.

Diazotrophe - Organisme capable de se développer avec N_2 comme seule source d'azote.

DIC - *Dissolved inorganic carbon* ou carbone minéral dissous, soit CO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-}. Ces entités sont en équilibre dans l'eau. L'hydrogénocarbonate (bicarbonate) domine en eau neutre ou alcaline (valeur des pK en eau douce) :

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \underset{pKa_1 = 6,4}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} HCO_3^- \underset{pKa_2 = 10}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} CO_3^{2-}$$

Le carbone assimilé par la rubisco est sous forme de CO_2. Par contre il est utilisé par la plupart des carboxylases du métabolisme sous forme de HCO_3^- (bicarbonate), notamment la phosphoénolpyruvate carboxylase qui fonctionne dans les plantes C4. D'où l'importance de ces conversions. L'eau de mer a un pH de 7,8-8,2. La DIC est de l'ordre de 2 mM, se répartissant en bicarbonate 1,8 mM, carbonate 0,35 mM, gaz carbonique 0,01-0,02 mM.

Diffusion facilitée - Migration à travers une membrane obéissant au même principe qu'une diffusion passive, mais accélérée par un transporteur ou un canal ionique spécifique de substrats déterminés.

Diffusion passive - Migration de molécules ou d'ions à travers une membrane en allant de la concentration la plus élevée à la concentration la moins élevée.

Dinoflagellés - Dinophytes ou algues unicellulaires flagellées et planctoniques, se nourrissant de diatomées, renfermant de la chlorophylle c. Les dinoflagellés comportent divers caractères inhabituels au niveau de leur matériel génétique (nombreux chromosomes et grande quantité d'ADN non associé à des histones, où l'hydroxyméthyluracile remplace la thymine). Il existe divers genres fluorescents (*Noctiluca*, *Gymnodinium*, *Peridinium*, *Pyrodinium*, *Gonyaulax*). La population des dinoflagellés peut atteindre dans certaines conditions des densités élevées. *Gonyaulax polyedra* est souvent responsable de la luminescence des océans, les cellules émettant à la suite d'une stimulation mécanique des flashes de lumière brefs et intenses bien visibles dans l'obscurité (par exemple sous le choc des rames). Les *Noctiluca* sont bien connus pour leur formation de "marées rouges". La prolifération des dinoflagellés, parfois éphémère, est responsable d'intoxications pouvant atteindre l'homme, et rendre le poisson ou les coquillages inconsommables.

Dioxines - Terme générique regroupant une gamme de composés chlorés dérivés de la dibenzo-*p*-dioxine, contenant deux cycles benzéniques reliés par deux ponts oxygène. Composés toxiques en fonction du nombre d'atomes de chlore et de leur position. Le plus dangereux est le TCDD ou 3,4,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine.

Dioxygénase - Enzyme d'oxydation utilisant O_2, introduisant les deux atomes d'oxygène sur la molécule substrat à des positions séparées (la liaison entre les deux atomes de l'oxygène diatomique est rompue). Les dioxygénases ouvrant le cycle aromatique en *ortho* ou *méta* fonctionnent avec du fer non héminique, respectivement Fe(III) et Fe(II), sans source d'électrons auxiliaire. Les dioxygénases catalysant la double hydroxylation du cycle aromatique, formant un *cis*-dihydrodiol, ont une NADH-ferredoxine réductase de nature flavinique,

un transporteur d'électrons (ferrédoxine) et une hydroxylase ou ISP, généralement sous forme $\alpha_3\beta_3$, contenant du fer non héminique et un noyau Fe/S dans chaque sous-unité α. Certaines dioxygénases opèrent en introduisant un seul atome d'oxygène dans le substrat, le second servant à oxyder et décarboxyler le 2-oxoglutarate en succinate et CO_2. Ces dioxygénases utilisant le 2-oxoglutarate sont assez répandues, ne font pas que des hydroxylations mais participent à d'autres réactions telles que des désaturations.

Dissimilation - Série de transformations réductrices n'aboutissant pas à l'élaboration d'une entité directement assimilable par le métabolisme cellulaire. La dissimilation s'oppose donc à l'assimilation. Néanmoins dans certaines conventions, une dissimilation ne produit pas de potentiel membranaire, ce dernier cas de figure étant réservé à la respiration.

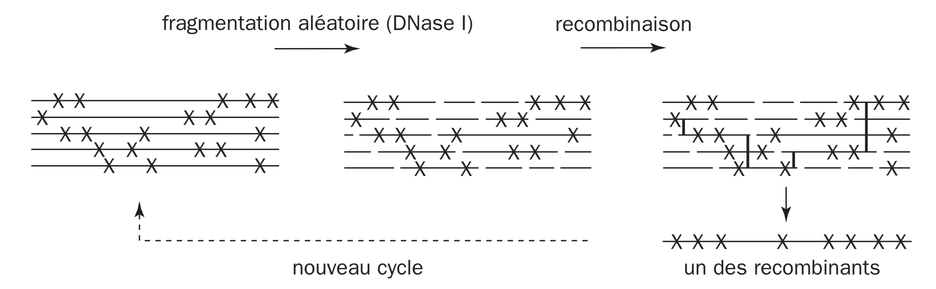
Dithionite - Agent réducteur très utilisé expérimentalement sur enzymes et transporteurs d'oxydoréduction, correspond à l'ion $S_2O_4^{2-}$. Le vrai réducteur est son produit de dissociation : $S_2O_4^{2-} \rightarrow 2\ SO_2^-$; $SO_2^- + H_2O \rightarrow HSO_3^- + H^+ + e^-$. La réduction est donc la plus rapide sur des cibles réduites électron par électron (flavines, cytochromes, fer-soufre), plus lente sur des accepteurs à deux électrons (hydrure) comme NAD^+.

DMSO - Diméthylsulfoxyde. Produit dans la nature par oxydation du diméthylsulfure, et présent dans les effluents des papeteries.

DMSO réductase - Réduit le DMSO et le diméthylsulfure. Peut intervenir comme accepteur respiratoire. Chez *Escherichia coli* l'enzyme DmsABC est attachée à la membrane par DmsC, et la partie catalytique DmsAB est tournée du côté cytoplasmique. La sous-unité DsmB renferme 4 noyaux [4Fe-4S]. DsmA possède un cofacteur à molybdène de type MGD. L'enzyme accepte plusieurs sulfoxydes et pyridine-N-oxydes. Chez d'autres espèces l'enzyme peut-être périplasmique. C'est le cas de *Rhodobacter capsulatus*, où la structure de la réductase a été déterminée à haute résolution par analyse cristallographique.

Dnase I (protection à) **-** Technique consistant à localiser les portions d'ADN liées spécifiquement par une protéine. Celle-ci recouvre la double hélice suffisamment pour empêcher son hydrolyse. Les portions restées libres sont scindées. Après traitement, la portion protégée est isolée par électrophorèse et séquencée.

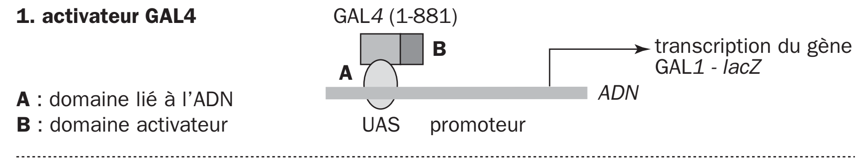
DNA shuffling - Méthode permettant de recombiner rapidement des fragments d'ADN homologues portant chacun une ou plusieurs mutations ponctuelles, et d'obtenir à nouveau un segment de longueur identique à celle des fragments de départ, mais emportant une série de mutations distribuées au fil des recombinaisons au hasard comme l'indique le schéma :

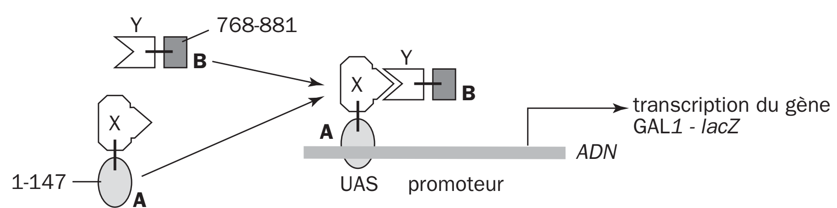


Les segments de départ, variants d'une même séquence initiale, sont fragmentés aléatoirement par DNase, et par amplification sans amorce extérieure mais servant d'amorces mutuelles conduisant à leur allongement par la polymérase. À l'arrivée s'obtient une séquence nouvelle, de même longueur qu'au départ (en principe 1 kb), renfermant un lot de mutations. Lorsque ce lot correspond à une séquence favorable, il est à nouveau amplifié par PCR classique. On obtient très rapidement ainsi une évolution artificielle de la séquence de départ qui est passée au crible de la sélection (STEMMER WPC (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 10747-10751).

DOPA : 3,4-dihydroxy-*L*-phénylalanine.

Doubles hybrides (méthode des) - Technique de biologie moléculaire permettant de détecter l'association spécifique de deux protéines, ou de rechercher systématiquement les facteurs protéiques qui s'associent à une protéine déterminée. Elle est fondée sur l'expression d'un gène rapporteur (*lacZ*) dans une souche recombinante de levure. Quand il y a transcription de ce gène, la levure fait de la β-galactosidase et ses colonies sont facilement repérées sur boîte par une réaction colorée catalysée par l'enzyme. L'activateur de transcription GAL4, de structure A-B comporte un domaine **A** qui reconnaît l'ADN sur un site UAS (voir cette rubrique) en amont du promoteur, et un domaine **B** nécessaire à l'activation. L'idée est de remplacer GAL4 par ses deux parties A et B séparées, l'une étant réunie à une protéine étrangère (x), l'autre à une autre protéine (y). Ces manipulations se font par recombinaison génétique sur deux plasmides séparés, conçus pour faciliter l'insertion d'un gène étranger et faciliter la sélection des recombinants. Ils sont introduits dans la levure, dont on ne sélectionne que les cellules qui ont reçu à la fois les deux plasmides. Ces cellules font alors les deux protéines chimères A-x et B-y, mais ne synthétisent de la β-galactosidase (test positif) que si les parties x et y s'associent, en reconstituant un activateur fonctionnel (A-x, y-B).





Méthode des doubles hybrides

La méthode permet aussi un criblage systématique à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ou cDNA) de tous les clones comportant un facteur y. Une fois soudés à B en y-B, ils sont susceptibles de s'associer à un activateur incomplet A-x pour reconstituer un activateur fonctionnel (A-x,y-B) contenant A et B et capable d'activer l'expression de *lacZ*. Une autre application est la recherche des domaines favorisant au sein d'une protéine son association avec une autre, ou encore sa propre oligomérisation (association entre molécules identiques).

Eau de mer - Composition moyenne en éléments minéraux (environ 35 g/L de sel, contre 38 g/L en Méditerranée, 270 g/L dans la Mer Morte, seulement 17,5 g/L dans la Mer Noire et 13 g/L dans la Caspienne).

	Cl^-	Na^+	SO_4^{2-}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	K^+	HCO_3^-	Br^-
g/L	19,3	10,7	2,69	1,29	0,41	0,39	0,15	0,07

ECF - *Extra-cytoplasmic function sigma factor*. Facteur d'amorçage de transcription, ou facteur sigma, spécialisé dans l'expression de gènes commandés par des signaux extérieurs au cytoplasme : agents métalliques, protéines endommagées dans le périplasme, irradiation lumineuse, lésions de la paroi… Les promoteurs reconnus appartiennent à un type standard bien conservé. Chez *E. coli*, le facteur sigma-24 ou sigma-E est le produit du gène *rpoE*. Il est induit par un choc thermique et concerne la réparation ou l'élimination des protéines du périplasme. (Voir Facteur d'amorçage, Régulon).

EDTA - Ethylènediamine-tétraacétate. Agent complexant des cations divalents.

Effet de serre - Réchauffement climatique général causé par un certain nombre de gaz de l'atmosphère qui retiennent la chaleur induite par le rayonnement solaire ainsi que l'énergie du rayonnement thermique de la surface du sol et des mers. La terre reçoit en moyenne 350W/m^2, soit sur une surface perpendiculaire au rayonnement solaire environ 1360 W/m^2. Les gaz à effet de serre retiennent l'infrarouge émis par la surface et le transforme en chaleur en fonction de l'énergie absorbée et de la vibration des liaisons moléculaires. La vapeur d'eau est responsable de plus de la moitié de l'effet de serre, mais les effets de l'eau sont compliqués par la formation des nuages, qui réfléchissent de l'énergie vers l'espace et vers le sol (albedo). La nébulosité est soumise à de nombreux facteurs, est encouragée par les aérosols et poussières formant des germes de condensation (trainées des avions). Les autres gaz sont le CO_2, présent à 370 ppmv dans l'atmosphère et le principal responsable de l'effet de serre, le CH_4 (1,8 ppmv), le N_2O (0,3 ppmv) et l'ozone (0,03 ppmv mais variable). Ajoutent leurs effets les chloro-fluorocarbures (CFC). Le rôle des activités humaines dans l'augmentation des gaz à effet de serre comme le CO_2 est démontrée par l'étude de leur composition en isotopes.

Elastomère - Résulte comme une matière plastique de la polymérisation de monomères naturels ou artificiels, mais s'en distingue par une propriété physique essentielle qui est de se déformer à la moindre sollicitation mécanique. Entrent dans cette catégorie les caoutchoucs, naturels à partir de l'*Hevea brasilensis*, ou artificiels à partir de la pétrochimie.

Electron-volt (eV) **-** Unité d'énergie. Lorsqu'un ensemble de N électrons (N, nombre d'Avogadro : 6,022 10^{23}) passe d'un système S1 à un système S2 tel que le saut de potentiel E2 – E1 est de 1 volt , il libère une énergie de 1 électron-volt (eV), soit 96,49 kJ.

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assays*. L'antigène fixé sur un support (verre ou membrane) est reconnu par une IgG anticorps. Le complexe fixé est reconnu à son tour par un deuxième anticorps anti-IgG fourni par une espèce différente, et soudé à une enzyme permettant la détection du nouveau complexe antigène-anticorps-anticorps anti-IgG-enzyme. On utilise souvent la peroxydase (réaction colorée). Nombreuses variantes. Par exemple l'anticorps peut être immobilisé sur le support et c'est l'antigène qui est soudé à une enzyme. L'antigène ainsi conjugué est mis en compétition avec l'antigène libre du milieu à doser. La quantité d'antigène conjugué à l'enzyme, retenu par le support et dosé par la réaction enzymatique, varie inversement avec l'antigène compétiteur libre.

EMP (Voie d'EMBDEN-MEYERHOF) **-** Voir Glycolyse.

Enantiomères - Appelés aussi inverses optiques. S'applique aux molécules renfermant un carbone asymétrique, ou toute autre structure conférant une chiralité. Voir chiralité.

Endospore - Spore formée à l'intérieur d'une cellule dite végétative, et libérée après destruction de celle-ci. La spore et la cellule végétative résultent d'une division asymétrique déclenchée par des facteurs du milieu et mettant en jeu pas moins de 80 gènes chez les *Bacillus*, connus pour faire des spores particulièrement résistantes à la chaleur, possédant de l'acide dipicolinique, une paroi épaissie et une teneur en eau très basse. Voir Formes de résistance.

Entérobactéries - Groupe de bactéries Gram-négatives dans lequel se trouve le colibacille, en principe spécialisées pour la vie dans le tube digestif animal mais très répandues dans la nature. Genres importants : *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*. Dégradent les sucres par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF (EMP), font du formiate à partir du pyruvate, font en majorité des fermentations acides mixtes et produisent du gaz. Les tests biochimiques classiques sont fondés sur l'utilisation du lactose, la formation d'indole, l'hydrolyse de l'urée, la production de H_2S et la formation de butanediol.

ENTNER-DOUDOROFF (voie d') **-** Métabolisme du glucose selon une voie spéciale caractéristique de diverses bactéries Gram-négatives, notamment des *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*. Décrite dans les livres de Microbiologie. Le glucose-6-phosphate est oxydé en 6-phosphogluconate, déshydraté en un produit caractéristique, le KDPG ou 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate. Celui-ci est scindé par aldolisation en pyruvate et glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P).

EnvZ - Premier terme d'une régulation à deux composants actionnée par la pression osmotique. Sa structure est connue et représente l'archétype des protéines jouant le rôle de capteur dans ces régulations, avec un domaine périplasmique, un domaine cytoplasmique contenant une histidine phosphorylable et responsable de la dimérisation de la protéine, un domaine kinase liant l'ATP. Une des cibles de EnvZ est OmpR. Voir OmpR, Régulations à deux composants.

Epoxyde - Composé résultant de l'addition d'un atome d'oxygène sur une double liaison, formant un cycle triangulaire réactif donnant facilement des réactions d'addition.

Euryarchaeotes - Voir Archaebactéries.

Estérase - Enzyme catalysant l'hydrolyse d'un ester. La réaction est réversible, mais favorise l'hydrolyse dans les conditions habituelles.

Etat stationnaire - Equilibre dynamique atteint au cours d'une succession de réactions dans un même flux métabolique, quand toutes les concentrations intermédiaires sont constantes (chaque intermédiaire est utilisé aussi vite qu'il est produit).

Etat de transition - Forme intermédiaire théorique, non isolable, par lequel une molécule passe au cours d'une transformation réactionnelle élémentaire, correspond au sommet d'une colline énergétique accompagnant les déformations de liaisons, ionisations ou distorsions ; sa structure exacte est pressentie par des considérations théoriques ou par comparaison avec des molécules stables.

Eubactéries - Division majeure des procaryotes, avec les archaebactéries. On y distingue au moins 11 groupes sur la base de l'ARN 16S. Voir notamment Bactéroïdes, Gram-positives, Cyanobactéries, Planctomyces, Protéobactéries, Sulfato-réducteurs, Sulfureuses vertes.

Euglènes - Algues flagellées monocellulaires, très ubiquitaires et caractérisées par leur grand pouvoir d'adaptation. Résistantes aux variations de pH (2-10), de salinité, de température (15-40°C), de conditions d'éclairement. L'espèce la plus étudiée au laboratoire est *Euglena gracilis*. Les euglènes peuvent se développer en autotrophie par photosynthèse et forment alors des réserves carbonées autour du chloroplaste sous forme de paramylon (β-1-3-glucane), en organotrophie à l'obscurité, avec régression du chloroplaste, croissance sur substrats carbonés (synthèse de paramylon autour des mitochondries), enfin en photo-organotrophie qui est une combinaison des deux modes précédents. Le lactate est transformé par la mitochondrie en CO_2. Celui-ci est récupéré par le cycle de CALVIN à taux plus élevé qu'à partir du CO_2 externe, et il en résulte une accélération de la croissance. Certaines euglènes possèdent des hydrogénosomes et une hydrogénase (voir ces termes). Les euglènes sont d'excellents modèles de laboratoire pour des études variées portant sur la dégradation des xénobiotiques, la pharmacologie, les mécanismes d'adaptation et le métabolisme des cellules hépatiques, dans lequel on retrouve curieusement certaines analogies avec celui de l'Euglène.

Eutrophisation - Enrichissement des eaux par des composés carbonés, azotés ou phosphorés, qui déclenchent une prolifération intempestive d'algues, de plantes et de cyanobactéries, avec des effets pervers sur la faune aquatique.

Exciton - Energie d'excitation, associée au déplacement d'un électron vers un niveau d'énergie plus élevé, transmise de molécule à molécule sans transfert de masse (diffusion) ou d'électricité (conduction d'un courant). Les physiciens considèrent un exciton comme une quasi-particule se déplaçant par sauts successifs en décrivant le transfert d'énergie dans un semi-conducteur. Un exciton est particulièrement instable, et ne se maintient que si le transfert est ultra-rapide, faute de quoi l'énergie serait perdue sous forme de chaleur.

Exotoxine - Protéine toxique rejetée dans le milieu, généralement thermostable engendrée dans le métabolisme normal ou à la suite d'un état de stress, souvent liée à la présence d'un plasmide.

Extrêmophiles - Organismes vivant dans des environnements où les conditions s'écartent fortement de celles qui règnent habituellement là où se développent la plupart des espèces vivantes :

- froid permanent (< 5°C, organismes psychrophiles) ;
- température élevée, souvent forte concentration d'éléments métalliques (hyperthermophiles) ;
- température élevée et milieu acide des sources volcaniques sulfureuses, lacs volcaniques (acidophiles) ;
- haute concentration en sel des lagunes d'évaporation, archaebactéries et algues (halophiles) ;
- eaux salées et très alcalines à pH > 10 ;
- hautes pressions dans les grands fonds marins (barophiles).

F420 (coenzyme) **-** Déazaflavine particulière des méthanogènes, fonctionnant deux fois comme coenzyme d'oxydoréduction du méthényl-MPTH4 au méthyl-MPTH4, ainsi que lors de la dernière phase productrice du méthane.

F430 (facteur) **-** Cofacteur à structure porphyrinique modifiée, contenant du nickel, intervenant dans la dernière étape de la méthanogénèse.

Facteur de croissance - Composé organique nécessaire en faible quantité à la croissance, parce qu'il est pour la cellule un composant essentiel qu'elle ne peut pas synthétiser par elle-même. C'est souvent un coenzyme ou son précurseur. Pour les organismes supérieurs, on utilise plus couramment le terme de vitamine.

Facteur d'amorçage - Appelé aussi facteur sigma. S'associe à un promoteur sur l'ADN et à l'ARN-polymérase, formant un complexe ternaire permettant l'amorçage de la transcription. À ne pas confondre avec les activateurs de transcription, dont l'action est plus spécifique de certaines régions de l'ADN et opèrent de façon différente. Un facteur sigma se lie à l'ARN-polymérase, permet à l'association formée de reconnaître une portion d'ADN appelée promoteur. L'ARN-polymérase peut alors former avec l'ADN un complexe "fermé". Le démarrage de la transcription en aval se fait par un complexe "ouvert" impliquant la séparation locale des deux brins d'ADN, l'un d'eux servant de modèle. Pour transcrire tous les gènes de son patrimoine, la cellule dispose de plusieurs facteurs sigma, chacun étant capable de reconnaître un type déterminé de promoteur et de commander la transcription d'une collection de gènes faisant partie d'un régulon (Voir Régulon). Cette situation a été bien répertoriée chez *E. coli*, avec au moins 7 sigmas différents. Le plus abondant est le sigma-70 (s^D ou RpoD) qui assure les "fonctions de ménage", soit un millier de gènes. La séquence du promoteur contient deux "boîtes" – 35 et – 10 séparées par 17 pdb : TTGACA-x_{17}-TATAAT. D'autres facteurs commandent des régulons spécialisés, et reconnaissent des promoteurs distincts. Le conservatisme de séquence du sigma-70 et sa présence universelle chez les eubactéries en font maintenant un indicateur très utilisé pour la filiation évolutive des espèces, au même titre que l'ARN16S. Le sigma-54 ou RpoN dirige une quinzaine de gènes du métabolisme azoté sur CTGGxA-x_6-TTGCA (boîtes – 24 et – 12), le sigma-38 (σ^S ou RpoS) concerne une centaine de gènes réglant l'entrée en phase stationnaire, le sigma-32 (σ^H ou RpoH) est celui du choc thermique (une quarantaine de gènes). Chaque facteur sigma correspond donc à un régulon et reconnaît les promoteurs appartenant à un consensus spécifique. Tous appartiennent à un même modèle structural, où un domaine reconnaît le promoteur sur l'ADN et un autre la liaison avec la sous-unité b de l'ARN-polymérase. Ce système de reconnaissance spécifique n'est pas toujours suffisant, et peut ne lancer la transcription qu'avec l'intervention supplémentaire d'un activateur de transcription. Dans d'autres cas au contraire, des protéines jouant un rôle régulateur s'associent au sigma pour l'empêcher d'agir (voir ECF). Les facteurs 70 et 38 (RpoD et RpoS) présentent des similitudes structurales, reconnaissent en commun certains promoteurs et entrent en compétition dans certaines conditions. L'abondance et l'activité de ces facteurs est soumise à des contrôles *in vivo* : ARN 6S, surenroulement de l'ADN, protéases spécifiques.

FAD - Flavine-adénine-dinucléotide.

Fenton (Réaction de) **-** Engendre des radicaux hydroxyle à partir de superoxyde et de peroxyde : $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH^\bullet + OH^- + O_2$. Catalysée par les ions ferreux. Les radicaux formés réagissent avec une grande quantité de substances, raison pour laquelle le fer est

indirectement toxique lorsqu'il est à l'état libre. Chez les êtres vivants le fer est presque toujours séquestré.

Fer - Le métal de transition le plus abondant de la biosphère. Oscille entre les états Fe(II) et Fe(III), intervient dans de nombreuses oxydoréductions, dans le transport ou le stockage de O_2 Protéines héminiques : cytochromes, catalases, peroxydases, hémoglobines ; non héminiques : protéines fer-soufre, oxydases, oxygénases. Les principaux ligands du fer dans les protéines sont habituellement la cystéine, l'aspartate, le glutamate, l'histidine et la tyrosine. Les minerais de fer sont la magnétite (Fe_3O_4), l'hématite (Fe_2O_3, la forme la plus abondante), la goethite (Fe_2O_3, H_2O), la limonite (goethite avec oxydes hydratés), la sidérite ($FeCO_3$), la pyrite (FeS_2). Le fer de Lorraine exploité jusqu'en 1977 est une sidérite impure appelée minette.

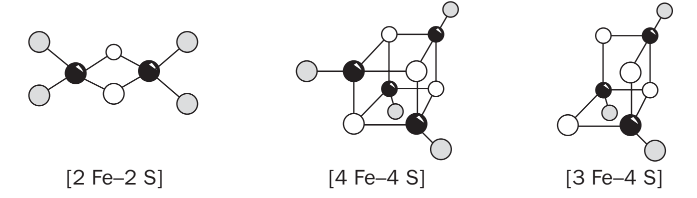
Fermentation - Oxydation cellulaire d'un substrat organique où une formation d'ATP a lieu en phase soluble par couplage direct au niveau d'une ou plusieurs réactions, sans passer par la formation intermédiaire d'un potentiel électrochimique membranaire. L'accepteur d'électrons est le plus souvent un produit de dégradation du substrat, et chaque fermentation se caractérise par le rejet abondant d'un ou plusieurs produits incomplètement transformés. Certaines fermentations ont lieu en présence d'air (lactobacilles).

Ferrédoxine - Petite protéine renfermant un ou plusieurs noyaux fer-soufre, sans activité enzymatique, fonctionne comme transporteur d'électrons entre d'autres protéines qui ont elles-mêmes des noyaux fer-soufre. Procaryotiques ou d'origine procaryotique (bactéries, mitochondries, plastes), interviennent souvent en conditions très réductrices, leur potentiel étant le plus souvent inférieur à – 250 mV. Souvent remplaçables par des flavodoxines.

Ferritine - Protéine de stockage du fer, comportant 24 sous-unités et renfermant 1000-3000 ions ferriques sous forme d'hydroxyde et de phosphate. Le fer entre ou sort de la protéine sous forme de fer réduit. La ferritine a en même temps les propriétés d'une ferroxydase. Les ferritines bactériennes (bactérioferritines) peuvent renfermer également une porphyrine (hème B).

Ferrozine - 3-(2-pyridyl)-5,6-bis-(4-phénylsulfonique acide)-1,2,4-triazine pour dosage de Fe^{2+}.

Fer-soufre (noyaux ou centres) **-** Cofacteurs contenant à part égale du fer et du soufre, facilement détachable par traitement acide et désigné comme acido-labile. Contenus dans une gamme très étendue de protéines dites Fe/S, qui sont en majorité des transporteurs d'électrons et des protéines d'oxydoréduction. Les plus simples sont les ferrédoxines. Dans les enzymes un ou plusieurs noyaux sont généralement associés à d'autres cofacteurs, flavines, porphyrines, cofacteurs à molybdène, éventuellement des noyaux fer-soufre complexes comme dans les hydrogénases et nitrogénases. Les plus courants sont [4Fe-4S] et [2Fe-2S]. Attachés à la protéine par des liaisons entre le fer et des résidus de cystéine, parfois d'histidine (voir RIESKE). Des noyaux fer-soufre plus complexes existent dans les hydrogénases, nitrogénases, et CO déshydrogénases. L'oxydoréduction fait changer ordinairement l'état du noyau de $[\ ]^{2+}$ à $[\ ]^{+}$. Les atomes de fer ont une coordination à peu près tétraédrique et sont à l'état haut-spin ; par suite du couplage le noyau est pratiquement silencieux à la RPE, mais après addition d'un électron, une distorsion crée des états de spin de S = 1/2 et S = 3/2.



La spectroscopie MÖSSBAUER est utlisée après remplacement du fer par l'isotope fer-57, qui a un spin nucléaire. Le potentiel E'° des [4Fe-4S] est habituellement entre – 350 et – 500 mV, fortement modulé par la structure conformationnelle de la protéine. Une équilibre entre $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ et $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$ correspond à un potentiel beaucoup plus élevé de l'ordre de

+ 350 mV, mais n'intervient que plus rarement. Le potentiel des [2Fe-2S] liés à 4 résidus de cystéine est inférieur à – 250 mV, surtout dans les ferrédoxines de plantes liées à la photosynthèse. Dans les protéines d'oxydoréduction de type RIESKE, le noyau est lié à deux résidus de cystéine et deux d'histidine, le potentiel est plus élevé, se rapproche de – 150 mV. Les noyaux fer-soufre ont également des fonctions ne relevant pas d'une oxydoréduction : [4Fe-4S] comme site catalytique de l'aconitase, comme capteur de O_2 dans FNR et SoxR, stabilisateur structural de l'endonucléase III de la réparation de l'ADN. Les noyaux fer-soufre peuvent se former spontanément en présence d'un taux suffisant de sulfure et de fer réduit et se sont très probablement formés aux âges les plus anciens quand prévalaient les conditions très réductrices.

Fertilisants - Ils sont de deux sortes, minéraux ou organiques. Les premiers contiennent une source d'azote minéral, du phosphate et K_2O. On tend à les désigner par leur analyse élémentaire (NPK). Par exemple du 10.4.8 contient 8 g de l'élément potassium pour 100 g du total. Le nitrate d'ammonium est représenté par 33.0.0 (pas de P ni K). On ajoute à ceci d'autres éléments, comme de petites quantités de sulfate de fer, de magnésium… Les fertilisants organiques sont apportés par épandage du traditionnel fumier animal, de déchets de poisson, de compost ou de préparations permettant une libération progressive d'azote sous l'action des bactéries (urée, formaldéhyde/urée).

FH4 - Voir Tétrahydrofolate.

Fimbriae - Filaments souples distincts des flagelles à la surface de nombreuses espèces bactériennes, surtout des Gram-négatives, contenant des protéines appelées adhésines.

Firmicute - Bactérie Gram-positive à épaisse couche de peptidoglycanes retenant le colorant de Gram. *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*.

FixL/FixJ - Système régulateur à deux composants de *Rhizobium* et espèces apparentées, déclenchant une cascade d'expression des gènes de l'assimilation de N_2 en l'absence de O_2. FixL est une protéine héminique à Fe(II) s'autophosphoryle sur histidine état "*on*", cette activité étant bloquée par interaction de O_2 avec le fer.

Flavines - Cofacteurs d'oxydoréduction très répandus, les principaux étant FAD et FMN. La troisième principale flavine dans la nature est la riboflavine ou vitamine B2. Le potentiel E'° de FAD et FMN est de + 190 mV, fortement modifié par insertion dans la protéine, souvent avec liaison covalente, de – 490 mV à + 19 mV. L'attachement covalent entre la protéine et FAD contribue à abaisser le potentiel. Les flavines peuvent fonctionner électron par électron ou par 2 électrons à la fois. Après réduction à 2 électrons de FAD, la forme réduite est $FADH_2$ ou seulement la forme semiquinonique FADH°, l'autre électron étant accepté par un site voisin. Les enzymes flaviniques ont souvent plusieurs cofacteurs, avec fer-soufre, métal… Voir Déazaflavines, Déshydrogénases, Flavocytochrome, Flavodoxines, Flavo-enzymes, Réductases.

Flavocytochrome - Protéine héminique d'oxydoréduction (transporteur d'électrons ou enzyme) contenant une flavine qui est généralement FAD. L'hème est le plus souvent lié de façon covalente avec un cytochrome c.

Flavodoxines - Petites protéines contenant une flavine (FMN) fonctionnant comme transporteurs d'électrons interchangeables avec les ferrédoxines, qu'elles remplacent en cas de carence en Fe ou S. La forme radicalaire semiquinonique FMN^0 est fortement liée par la protéine, ce qui déplace son potentiel redox. E'° de $FMN/FMNH^0$ = + 50 mV au lieu de – 219 (FMN libre), $FMNH^0/FMNH_2$ = – 495 mV au lieu de – 219.

Flavo-enzymes - Fonctionnent à l'aide d'une flavine comme cofacteur, les plus importantes étant des oxygénases et des déshydrogénases, lesquelles sont appelées oxydases quand elles utilisent O_2 comme accepteur.

Flavonoïdes - Pigments végétaux solubles très variés de nature phénolique. Ils comportent un noyau de base en C15 ou flavone, constitué de deux cycles benzéniques A et B et d'un cycle pyrone soudé à A. Le noyau est généralement hydroxylé, surtout en 3, 5, 7 et 3'. Les termes hydroxylés en 3 sont appelés flavonols. Certains sont communs, comme le kaempferol (50% des angiospermes), la quercétine, la cyanidine et la lutéoline. Flavonoïdes et

isoflavonoïdes diffèrent par la position de la liaison entre A et B, et forment une gamme très vaste de produits naturels où le noyau est lié généralement à des glucides, le plus souvent en 3 et 7. Les animaux ne font pas de flavonoïdes, mais les flavones des ailes de certains papillons sont d'origine alimentaire. Tous ces produits dérivent métaboliquement de la phénylalanine comme tous les termes de la vaste famille des phénylpropanoïdes regroupant les coumarines, lignines, esters benzoïques.

Noyaux flavone et isoflavone

Floc - Boues formées dans les stations d'épuration par l'action de micro-organismes floculants ayant la propriété de s'agréger et d'entraîner diverses matières organiques ou minérales (ammoniaquées, phosphatées) qui se déposent et se concentrent dans les bassins de décantation avant rejet de l'eau traitée. La formation du floc est inhérente au bon fonctionnement d'une station d'épuration, et sa décantation est une opération essentielle, parfois entravée par divers facteurs parasites comme la prolifération de micro-organismes filamenteux.

FMN - Flavine-adénine-mononucléotide.

FNR - *Fumarate-nitrate-reduction*. Protéine régulatrice contrôlant l'expression des gènes liés à la réduction du nitrate et du fumarate, reconnaît la présence ou l'absence de O_2 grâce à un noyau fer-soufre [4Fe-4S] dont l'état d'oxydation dépend du potentiel redox du milieu. En absence de O_2, FNR se lie sous forme de dimère aux promoteurs d'une bonne cinquantaine de gènes impliqués dans le métabolisme anaérobie et active leur transcription, en réprime d'autres. De façon générale, FNR est donc l'agent d'une régulation globale ayant pour effet d'activer le métabolisme anaérobie au détriment du métabolisme aérobie, est représentatif avec CRP d'une super-famille de régulateurs de transcription très répandus chez de nombreuses espèces et consacrées à des fonctions similaires. Exemples : FixK de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, ANR de *Pseudomonas aeruginosa*, CysR (*Synechococcus*), NNR (*Paracoccus denitrificans*)…

Formes de résistance - Diverses espèces bactériennes ont la faculté de former des cellules spécialisées montrant une résistance accrue à des facteurs d'environnement défavorables, notamment à une température élevée, à l'absence d'éléments nutritifs ou à la dessiccation. Un vocabulaire particulier désigne les différentes formes de bactéries résistantes qui sont résumées par un tableau :

	Endospores	*Exospores*	*Cystes*	*Conidies*
Thermorésistance	Forte	Modérée	non	non
Cortex	Présent	non	non	non
Ac. dipicolinique	Présent	non	non	non
Nombre/cellule	1	1 - 4	1	N (chaîne)
Exemples	*Bacillus* *Clostridium* *Desulfomaculm* *Sporosarcina* *Thermoactinomyces*	*Methylosinus* *Rhodomicrobium*	*Azotobacter* *Myxococcus* *Sporocytophaga*	*Actinomyces* *Micromonospora* *Nocardia* *Streptomyces*

Les cyanobactéries font des acinètes. Les champignons forment des chlamydospores, qui sont des spores très résistantes formées par la condensation du cytoplasme et de la paroi. Des structures plus complexes sont les pycnides ou organes de résistance constituées par des agrégations mycéliennes avec spores. Il n'y a pas de démarcation nette entre spores de

propagation et spores de résistance, ces deux caractères se retrouvant dans celles des levures et de certains protozoaires.

Formiate - $HCOO^-$. Métabolite important du métabolisme intermédiaire anaérobie, notamment dans la décarboxylation du pyruvate (produit conjointement à l'acétyl-coenzyme A ou l'acétyl-phosphate). Le formiate est scindé en $CO_2 + H_2$ par la formiate-hydrogène lyase, ou sert de donneur d'électrons par la réaction de la formiate déshydrogénase dans la réduction du nitrate et du nitrite. Le formiate est également engendré par réduction de CO_2 (acétogènes, méthanogènes), donne lieu à une cascade de réductions après formylation du FH4 ou du MPTH4, et intervient dans le cycle de WOOD.

Formiate déshydrogénase (FDH) - Catalyse : $CO_2 + 2e^- + 2H^+ \leftrightarrow HCOOH$. On trouve une FDH chez de nombreux organismes : plantes, levures, bactéries aérobies et anaérobies, méthanogènes. Il en existe plusieurs sortes selon qu'elles réduisent le CO_2 en formiate, ou oxydent le formiate en CO_2 (notamment chez les aérobies). Sélénium souvent présent, apporté par un acide aminé modifié, la sélénocystéine. Le cofacteur est une bioptérine portant du molybdène ou parfois du tungstène. Les FDH appartiennent à plusieurs catégories. La formiate-$NADP^+$ oxydoréductase (EC 1.2.1.43) réduit le CO_2 par NADPH chez les acétogènes (*Clostridium thermoaceticum*), très sensible à O_2, catalyse réversiblement une oxydoréduction entre méthylviologène et NADPH. Les autres FDH sont des formiate-NAD^+ oxydoréductases (EC 1.2.1.2) ou des oxydoréductases réagissant avec des cytochromes ou d'autres accepteurs, comme le F420 (EC 1.2.2.1, EC 1.2.2.3). Les méthylotrophes oxydent HCOOH avec une assez grande variétés de FDH solubles utilisant NAD^+, les unes ayant une structure d'homodimère, dépourvues de cofacteur interne et résistantes à O_2 (levures méthylotrophes), les autres ayant une structure plus complexe avec bioptérine, Mo ou W, centres fer-soufre et flavine. Ces dernières FDH sont très sensibles à O_2. Les formiate déshydrogénases oxydant le formiate en CO_2 sont représentées chez *E. coli* par la FDH-N, dont le fonctionnement fournit des électrons à la nitrate réductase (NAR-A), et la FDH-H qui entre dans le complexe appelé formiate-hydrogène lyase (voir Formiate-hydrogène lyase). FDH-H et NAR-A sont des protéines membranaires complexes codées chacune par un opéron (*fdnGHI*, *narGHJI*), et sont en même temps des translocateurs de protons (conservation d'énergie). Ce système n'est synthétisé qu'en absence de O_2. Il a pour réplique un second système fonctionnant aussi en aérobiose (FDH-Z et NAR-Z). La FDH-H est distincte, extrêmement sensible à O_2, partiellement protégée par le formiate. Elle contient une seule chaîne de 79 kDa dont la structure détaillée est connue. Elle renferme un noyau fer-soufre de type [4Fe-4S] et le molybdène [Mo(IV) ou Mo(VI)] qui est lié directement à deux cofacteurs MGD et au sélénium d'un résidu de sélénocystéine.

Formiate-hydrogène lyase - Catalyse en anaérobiose la réaction de décomposition du formiate, soit $HCOOH \rightarrow CO_2 + H_2$. Etudiée en détail chez *Escherichia coli*, forme un complexe de deux enzymes : une formiate déshydrogénase ou FDH, la FDH-H, et une hydrogénase, l'hydrogénase-3. Le formiate apparaît par décarboxylation du pyruvate en cours de fermentation, et sa décomposition génératrice de gaz intervient en milieu acide. En somme le formiate des fermentations anaérobies engendre du CO_2 de deux façons selon la FDH impliquée, soit comme source d'hydrogène moléculaire par la formiate-hydrogène lyase dont la FDH-H fait partie, soit comme donneur d'électrons par la FDH-N pour la réduction du nitrate.

Formylméthanofurane - Cofacteur fonctionnant comme accepteur de formyle (–CHO) dans la méthanogénèse à partir de CO_2 et H_2.

Fractionnement isotopique - Les isotopes d'un même élément sont censés avoir les mêmes propriétés chimiques, mais la différence de masse engendre de petits écarts dans la réactivité des molécules qui les hébergent. Ainsi la photosynthèse actionnée par la Rubisco et le cycle de CALVIN assimile un peu plus vite le $[^{12}C]–CO_2$ que le $[^{13}C]–CO_2$. Les matières organiques synthétisées sont alors légèrement appauvries en carbone-13. L'écart est plus faible dans les plantes dites C4. Si le rapport R est le rapport $^{13}C/^{12}C$ dans un échantillon, et Ro ce rapport dans un standard, l'écart y est mesuré par $\delta = 1000 \times (R - R_0)/R_0$. Un des écarts les plus importants est lié à la synthèse biologique du méthane, et le déséquilibre est légèrement accru par les méthanotrophes, qui oxydent un peu plus vite le $[^{12}C]-CH_4$ que le

[^{13}C]-CH_4, avec comme résultat un CO_2 appauvri en carbone-13. L'écart δ est modifié de façon complexe par échanges entre les différents réservoirs de carbone, l'atmosphère, les carbonates, les matières organiques… Des fractionnements isotopiques sont également enregistrés pour l'hydrogène, le soufre, l'azote et le fer. De façon générale, ils portent la signature d'une activité biologique.

Frankia - Bactéries appartenant au groupe des actinomycétales, formant des filaments pluricellulaires ou hyphes mycéliens, ainsi que des vésicules et des spores. Saprophytes du sol, font une symbiose avec plus de 200 espèces de plantes dicotylédones, parmi lesquelles figurent des arbres et arbustes tels que les filaos et les aulnes, s'installent au niveau des racines qui subissent une transformation nodulaire en actinorhizes, et assimilent l'azote, qui est transmis à la plante principalement sous forme d'ammonium. Exemples de plantes colonisées : *Alnus*, *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Eleagnus*, *Hippophae*, *Myrica*, *Ceanothus*, *Dryas*. Dans les cellules nodulaires qu'elles infectent, les *Frankia* font des différenciations en hyphes, en sporanges producteurs de spores, et des vésicules où se trouve localisée la nitrogénase. Celle-ci produit de l'hydrogène, qui est oxydé par une hydrogénase. Il y a sécrétion par les filaments de diverses protéines, notamment des enzymes d'hydrolyse de la cellulose. Les nodules de certaines plantes (*Casuarina*, *Myrica*) ont une quantité notable d'hémoglobine. Les *Frankia* contiennent un taux de superoxyde dismutase particulièrement élevé, à rapprocher de la propriété des plantes de libérer du superoxyde et du peroxyde en réaction à un état de stress ou sous l'effet d'une infection.

Fulviques (acides) **-** Composés organiques solubles de couleur jaunâtre ou brune, récupérés dans le surnageant après précipitation des acides humiques par un acide.

G + C (Taux de) **-** La composition en guanine et cytosine d'une séquence d'ADN révèle la proportion des paires G-C dans la double hélice par rapport aux paires A-T. Cette proportion affecte la stabilité locale de l'ADN et intervient dans plusieurs mécanismes biochimiques de reconnaissance ADN-protéine. Elle tend à être constante tout au long du génome, en relation avec l'usage préférentiel des différents codons, lui-même en rapport avec la composition en ARN de transfert de la cellule. Un taux de G + C localement différent est un indice d'origine externe.

Fur (Protéine) **-** Protéine régulatrice mise en évidence dans *E. coli*, agissant en présence de Fe^{2+} comme répresseur des gènes codant pour les transporteurs du fer.

Gaïacol - *o*-Méthoxyphénol.

Gallique (Acide) **-** Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque.

Gène - Unité élémentaire du matériel génétique, spécifiant la synthèse d'un polypeptide déterminé ou d'un ARN spécifique (ARN de transfert, ARN des ribosomes, ARN viral, ARN messager).

Gène rapporteur - Pour voir si un gène s'exprime, on réalise artificiellement une fusion de celui-ci avec un gène rapporteur dont l'expression se fera dans la foulée et sera détectée par un test simple. On utilise souvent *lacZ*, le gène de la bêta-galactosidase de *E. coli* comme gènes rapporteur. On peut détecter aussi le fonctionnement d'un promoteur en soudant en aval le gène rapporteur, observer également la production de protéines régulatrices, difficiles à tester par une méthode simple, et généralement produites en faible quantité.

Génome - L'ensemble des gènes d'un organisme.

Génomique - Analyse des génomes par cartographie, séquençage, comparaisons évolutives et identification des gènes liés au phénotype.

Gentisique (Acide) **-** Acide 2,5-dihydroxybenzoïque.

GFP - *Green fluorescent protein*. Produit fluorescent de la méduse *Aequoria victoria*. Protéine fluorescente très stable, de 238 acides aminés, dont la structure détaillée en forme de cylindre est connue. Elle fluorescence vers 508 nm, et fonctionne *in vivo* par la lumière émise par l'aequorine. La GFP est couramment utilisée comme marqueur d'autres protéines pour les rendre fluorescentes. Son gène est utilisé aussi comme rapporteur : recombiné avec un autre gène dont on veut observer l'expression *in vivo*, il donne des renseignements sur les mécanismes régulateurs au niveau génétique. Cette technologie connaît de multiples

applications. Recombiné à un gène de résistance aux herbicides dans les plantes transgéniques, il peut servir à surveiller la dissémination éventuelle dans l'environnement des gènes artificiellement introduits. Une application à caractère spectaculaire a consisté à rendre fluorescent un lapin albinos (Eduardo Kac) nommé Alba, présenté comme une fantaisie à caractère artistique.

Glissement - Mode de déplacement sans flagelles sur une surface. Très répandu chez les procaryotes, notamment les Gram-négatifs, les cyanobactéries, les espèces colonisant les rhizosphères et les bactéries prédatrices (*Myxococcus*).

Glucanes - Polymères du glucose, linéaires ou ramifiés ; cellulose, amidon, dextrane…

Glutamate déshydrogénase - Catalyse la réaction :

$$\text{Oxoglutarate} + NH_3 + \text{NAD(P)H, H}^+ \rightleftarrows \text{glutamate} + \text{NAD(P)}^+ + H_2O$$

Le 2-oxoglutarate est un composé intermédiaire du cycle de KREBS, et la réaction, dont le sens thermodynamique favorable est vers la droite, participe à l'entrée de l'ammonium dans le métabolisme chez les végétaux, les champignons et les bactéries (chez les animaux, la principale source d'azote est constituée par les protéines et les acides aminés de l'alimentation).

Glutamate synthase - Absente dans le règne animal, catalyse la réaction :

$$\text{Glutamine} + \text{2-oxoglutarate} + \text{NAD(P)H, H}^+ \rightleftarrows 2\ \text{Glutamate} + \text{NADP}^+$$

L'enzyme est appelée également Glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT).

Glutamine synthétase - Catalyse la réaction :

$$\text{Glutamate} + NH_3 + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glutamine} + \text{ADP} + \text{phosphate}$$

Le glutamate est lui-même un lieu d'entrée de l'azote ammoniacal dans le métabolisme, à partir du 2-oxoglutarate. La formation de la glutamine est un second point d'entrée privilégié dans le métabolisme de l'ammonium, favorisé quand celui-ci est peu abondant. La réaction est essentiellement irréversible et engendre un produit (la glutamine) qui sera à son tour un donneur d'azote pour de nombreuses synthèses cellulaires (carbamyl-phosphate, arginine, cytosine, bases puriques, glycine, histidine, osamines, tryptophane…). Chez les bactéries l'enzyme est régulée allostériquement de façon complexe par intégration de multiples signaux, ainsi que par induction et répression.

Glutarédoxine - Protéine d'oxydoréduction similaire à la thiorédoxine et fonctionnant sur le même principe.

Glutathion - L-γ-glutamyl-L-cystéinyl-glycine (GSH), ubiquiste, le thiol à faible masse moléculaire le plus abondant. Il réagit dans deux directions principales.

1. Il participe à des oxydoréductions, car 2 molécules se lient par oxydation de leur thiol, pour former GSSG (formation d'un pont disulfure). Cette oxydation peut se réaliser notamment par la glutathion peroxydase à l'aide de H_2O_2 ; le GSSG est réduit à nouveau par une réductase à NADPH.

2. Dans une deuxième série de réactions, le glutathion forme des conjugués : il fonctionne comme cofacteur de diverses enzymes, par exemple les glutathion S-transférases : le glutathion réduit, GSH, exerce une attaque nucléophile sur différents accepteurs, un type de réaction extrêmement important chez les organismes supérieurs pour l'élimination d'agents toxiques comme les produits mutagènes. Le modèle est : RX + GSH $\rightarrow$ HX + RSG, où R peut être un radical aliphatique, aromatique ou hétérocyclique, X étant le sulfate, le nitrite, l'halogénure, un époxyde ou autre.

Les glutathion S-transférases ont été étudiées surtout chez les mammifères, et ont aussi la propriété de faire des isomérisations, comme celle de la maléylacétone en fumarylacétone. Les conjugués formés entre le glutathion par son thiol et un composé étranger (Glu-Cys-Gly)R peut être scindé par une γ-glutamyltranspeptidase, qui enlève le glutamate et crée le conjugué (Cys-Gly)R. Une hydrolyse par carboxypeptidase forme le conjugué (Cys)R, qui est métabolisé. Ce processus s'observe dans certaines biodégradations.

Glutathion (GSH)

$$HOOC{-}\underset{NH_2}{CH}{-}CH_2{-}CH_2{-}\underset{O}{\overset{}{C}}{-}\overset{H}{N}{-}\underset{\underset{SH}{CH_2}}{CH}{-}\underset{O}{C}{-}\overset{H}{N}{-}CH_2{-}COOH$$

Glu Cys Gly

Glycocalyx - Polysaccharides fibreux extracellulaires contribuant à l'adhésion des bactéries à la surface d'un support, parfois très abondants et formant une sorte de capsule autour des cellules.

Glycolyse - Terme généralement utilisé pour désigner l'oxydation du glucose en pyruvate par la voie de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Pour mémoire :

glucose → glucose-6-phosphate → fructose-6-phosphate → fructose-1,6-diphosphate → triose-phosphate (DHAP + 3-phospho-glycéraldéhyde) → 3-phosphoglycérate → 2-phospho-glycérate → phosphoénol-pyruvate (PEP) → pyruvate.

Glyoxylate (cycle du) **-** Métabolisme présent chez les plantes, les champignons et les bactéries, inexistant chez les animaux. Les étapes essentielles ; scission de l'isocitrate (isocitrate lyase) en glyoxylate $OHC\text{-}COO^-$ et succinate (court-circuit du cycle de KREBS entre isocitrate et succinate). Le glyoxylate et l'acétyl-CoA forment le malate (par la malate synthase), le malate conduit à l'oxaloacétate, qui redonne le citrate par une deuxième molécule d'acétyl-CoA. Retour au cycle de KREBS, à l'isocitrate. Le cycle du glyoxylate permet une récupération efficace de l'acétyle, intervient aussi dans la photorespiration.

Glyoxysomes - Voir Peroxysomes.

Golgi - Réseau de vésicules membranaires des cellules d'eucaryotes, formant un compartiment extracytoplasmique en communication fonctionnelle avec le réticulum endoplasmique mais non associé directement aux ribosomes. Le système de GOLGI intervient dans la maturation et le glycosylation des protéines qui transitent par lui, soit pour être exportées à l'extérieur de la cellule par exocytose, soit pour gagner d'autres compartiments cellulaires comme les lysosomes.

Gram (coloration de) **-** Coloration par le violet cristal permettant de distinguer deux grands groupes d'eubactéries en fonction de la structure de leur paroi. Les Gram-positifs fixent le colorant et le conservent après un court lavage par l'éthanol ou l'acétone, alors que les Gram-négatifs sont décolorés par ce lavage.

Gram-positives - Bactéries pourvues d'une épaisse couche de peptidoglycane entourant une membrane simple (pas de membrane externe et de périplasme), très répandues dans l'environnement. La composition en G + C est un critère taxonomique. Les formes à G + C élévé sont les actinomycètes (voir rubrique correspondante). Les formes à G + C faible se distinguent par leur morphologie (coques comme *Staphylococcus*, ou bâtonnets comme *Bacillus*), leur caractère aérobie (strict ou facultatif) comme *Bacillus,* ou anaérobie strict (*Clostridium*), et leur faculté de former ou non des endospores. Autres genres importants : *Enterococcus, Lactobacillus, Spiroplasma, Streptococcus, Listeria*. On rattache les mycoplasmes à ce groupe.

GSH - Glutathion.

Gyrase - Protéine nécessaire à la réplication de l'ADN, en compense les supertours que celle-ci génère. Introduit des supertours négatifs dans l'ADN et fait partie des topoisomérases II.

Habitat - Tranche d'espace, parfois microscopique (micro-habitat) où se rencontrent des conditions à peu près uniformes favorables à la multiplication d'une ou de plusieurs espèces. Il y a parfois confusion avec niche écologique. Celle-ci se rapporte moins au milieu de croissance qu'aux propriétés de ses habitants. Par exemple une espèce peut occuper une niche écologique caractérisée par l'assimilation de l'azote, mais peut se développer dans plusieurs habitats distincts où prolifèrent en même temps d'autres formes vivantes.

Halidohydrolase - Remplace un halogène par un hydroxyle dans un substrat organique.

Halogènes - Fluor, chlore, brome, iode. Le rayon de VAN DER WAALS et le caractère polarisable de la liaison carbone-halogène comparée à C–H croît dans le sens I > Br > Cl > F > H. L'énergie de dissociation et la polarité de la liaison carbone-halogène varient en sens inverse. La liaison C-F est la plus forte des liaisons simples qu'un carbone peut contracter, l'atome de fluor est à peine plus gros qu'un atome d'H. L'interaction de résonance entre les paires d'électrons de l'halogène avec le noyau aromatique augmente la densité électronique en *ortho* et *para*, et oriente en conséquence les substitutions électrophiles. Ainsi F est souvent un activateur d'une telle substitution, mais sa liaison avec le cycle aromatique est particulièrement stable et ses propriétés se démarquent de celles des autres halogènes. Le fluor est un marqueur commode en RMN du fluor-19.

Haloperoxydases - Peroxydases catalysant l'oxydation d'un ion halogénure avec H_2O_2, conduisant à la synthèse de composés halogénés naturels, comme certains antibiotiques (chloramphénical, auréomycine). Trouvées chez les bactéries, les champignons, les algues, les invertébrés, les mammifères. Les chloroperoxydases oxydent le chlorure, le bromure et l'iodure, les bromoperoxydases oxydent les deux derniers. La chloroperoxydase de *Caldariomyces fumago* est une protéine héminique. Diverses haloperoxydases sont des enzymes à vanadium, la plus étudiée étant celle de l'algue *Ascophyllum nodosum*.

Halons - Dérivés perhalogénés du méthane, tels que $CBrF_3$, CBr_2ClF.

Halophile - Organisme capable de se développer à une concentration élevée en sel, soit parce qu'il est tolérant au sel, soit parce que le sol à forte concentration lui est nécessaire. On peut distinguer les halophiles modérés, croissant dans le NaCl 3-15%, les halophiles intermédiaires (dans NaCl 9-24%), et les halophiles extrêmes (NaCl de 18 à 35%). La concentration en sel de l'eau de mer est environ de 3,5%, celle de la Mer Morte à peu près dix fois plus élevée. Les halophiles extrêmes sont des archaebactéries comme *Halobium salinarum*, sauf rares exceptions comme l'algue *Dunaniella salina*.

HAMMET (constante de) **-** Constante notée σ, qui caractérise les substituants du cycle aromatique en fonction de leur nature, et faisant partie de la fonction de HAMMET. Cette fonction s'efforce de formuler une prédiction quantitative sur le changement de réactivité apporté par le substituant en *méta* ou *para* du cycle en fonction du type de réaction (les effets en *ortho* sont plus compliqués). On peut se référer par exemple à l'équilibre d'ionisation dissociation de l'acide benzoïque C_6H_5COOH. La constante σ d'un substituant sur le cycle est définie par la fonction $\log(K/Ko) = \sigma\rho$, où ρ est égal à 1 pour l'acide benzoïque (dépend du composé aromatique), Ko la constante d'équilibre pour l'acide benzoïque non substitué, K cette constante après substitution. La constante de HAMMETT σ dépend donc du substituant (effet inductif, résonance), et sa détermination provient de mesures expérimentales de constantes d'équilibre ou de vitesses réactionnelles (voir MARCH J, *Advanced Organic Chemistry : Reactions, Mechanisms, and Structure*, McGraw-Hill). Une valeur positive de σ dénote un substituant attracteur d'électrons (facilite l'ionisation de l'acide benzoïque), une valeur négative indique un groupe donneur. Exemples de substituants attracteurs : Cl, Br, I, COOH, CN, NO_2, CN, NH_3^+. Exemples de substituants donneurs : NH_2, OH, OCH_3, CH_3. La valeur de s n'est pas la même en *méta* et en *para*, surtout pour les valeurs positives (et OH en particulier). Des complications naissent dans le cas de plusieurs substituants, ou lorsqu'un substituant présente une résonance électronique avec le noyau. De nouvelles constantes de HAMMETT modifiées sont notées σ^+ et σ^-. La modification est classique en particulier pour les halogènes avec leurs effets contradictoires. Tout en étant attracteurs (affaiblissent la charge électronique du noyau), ils sont l'objet d'une résonance (mésomérie) qui tend à faire apparaître une charge négative sur le cycle.

HAP - Hydrocarbures aromatiques polycycliques. Le naphtalène est le premier terme. Présents dans les huiles et carburants, contaminants des produits de combustion par les moteurs.

Haut potentiel (de transfert) **-** Une réaction de type $AX + B \rightarrow A + BX$, où un groupe X est transporté d'un donneur à un accepteur, s'effectue favorablement de gauche à droite si la variation d'enthalpie libre ΔG est négative. Le potentiel de transfert est cette variation d'énergie quand B est un accepteur de référence, généralement H_2O (énergie libérée par

hydrolyse pure et simple dans l'eau). Le potentiel de transfert est d'autant plus élevé que la valeur absolue de ΔG est plus grande (équivaut à une forte tendance de AX à se débarrasser de X). Dans les conditions standards, on définit un potentiel de transfert standard. Quand une chaîne de transporteurs se repassent le groupe X, servant alternativement d'accepteur et de donneur, le groupe X "s'écoule" dans le sens des potentiels décroissants.

HCFC - Hydrochloro-fluorocarbones utilisés en remplacement des CFC.

Hélicase - Enzyme catalysant la séparation des deux brins d'ADN en utilisant l'ATP comme source d'énergie.

Hème - Désigne à l'origine la ferroporphyrine située au nombre de 4 dans l'hémoglobine. C'est la protoporphyrine IX contenant Fe^{2+}, soit l'hème B des cytochromes b. L'oxydation du fer en Fe^{3+} conduit à l'hémine. Pour simplifier dans l'usage courant, on désigne par hème une porphyrine contenant du fer sans préciser l'état d'oxydation qui varie dans les cytochromes, et on précise sa catégorie par une lettre majuscule. Les différentes sortes d'hèmes (hème A, hème B, hème D1...) se distinguent par les chaînes latérales de la porphyrine et dans certains cas le noyau de celui-ci (voir aussi Sirohème). Un hème C est attaché par des liens covalents sur un motif caractéristique de la protéine. Les cytochromes sont désignés par des lettres minuscules. Exemple : un cytochrome b renferme de l'hème B, un cytochrome cd_1 renferme un hème C et un hème D_1 ; un cytochrome aa_3 contient deux hèmes A qui se distinguent par leurs propriétés. Le spectre caractéristique et les propriétés d'oxydoréduction des hèmes dans les protéines héminiques sont modulées par l'environnement moléculaire. Le fer dans un noyau hème est hexacoordonné selon une géométrie octaédrique (éventuellement déformée), ou pentacoordonné. Dans ce cas la sixième position peut-être complétée par une molécule d'eau, de O_2, CO, NO..., notamment dans les protéines ayant une action enzymatique ou fonctionnant comme transporteur terminal d'une chaîne d'oxydoréductions. Les modifications au niveau de l'hème peuvent être suivies par RPE et spectre d'absorption. Voir Porphyrines.

Hémicelluloses - Polysaccharides hétérogènes des parois végétales, constitués notamment de xylanes, arabinoxylanes, mannanes, galactomannanes, glucomannanes, arabinogalactanes II, β-1,3-glucanes et β-1,3-β-1,4-glucanes. Ces polymères sont interconnectés entre eux, ainsi qu'avec des microfibrilles de cellulose et de pectines. Le terme d'hémicellulose désigne parfois empiriquement les constituants qui sont facilement solubilisés par la soude diluée après enlèvement de la lignine. Voir Parois végétales.

Héminique (Protéine) **-** Protéine caractérisée par la présence d'au moins une porphyrine dans laquelle est logée du Fe(II) ou du Fe(III).

Hémolysine - Toxine protéique provoquant la lyse des hématies, favorise la dissémination de l'agent pathogène en lui apportant une source de fer.

Hétérocystes - Cellules intercalées dans les chaînes de cellules cyanobactériennes, différenciées par un bouleversement important de l'expression des gènes en faveur de l'assimilation de N_2 : enveloppe spéciale, induction de la nitrogénase, mise en veilleuse ou suppression du PS2 (évite la production d'O_2), modifications du métabolisme intermédiaire...

Homoacétogène - Acétogène dont l'activité anaérobie ne produit que de l'acide acétique.

HPr (protéine) **-** Protéine cytoplasmique de faible masse, oscillant entre l'état phosphorylé et non phosphorylé. La forme phosphorylée sur résidu d'histidine (HPr-P) a un haut potentiel de transfert de phosphate et sert de donneur dans plusieurs systèmes, dont la phosphotransférase, le contrôle de la synthèse de l'AMP cyclique, et les perméases. C'est donc un intermédiaire dans une cascade régulatrice, analogue aux systèmes à deux composants mais en plus compliqué, agissant sur une cible protéique phosphorylable.

HQNO - 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxyde, inhibiteur respiratoire comme analogue des ubiquinones, bloque la réduction de celles-ci.

Hsp - *Heat Chock protein* ou protéine du choc thermique chez les bactéries. Exemples : Hsp-60, Hsp-70, Hsp-90. Le chiffre qui les caractérise est leur masse moléculaire approximative en kDa.

HU - Petite protéine basique, liée non spécifiquement à l'ADN (petit sillon), jouant un rôle dans l'emballage interne de l'ADN bactérien et formant des zones compactes ou "nucléoïdes" (FRIEDMAN DI (1988) *Cell* **55** : 545-554).

Humiques (acides) **-** Matériel organique mal défini, riche en cycles aromatiques et de couleur brunâtre, extrait à partir du sol par différents réactifs (et notamment par la soude diluée), et précipitable en milieu acide (pH 1-2). Voir AHDS, Humus.

Humus - Ensemble des matières organiques du sol transformées par voie biologique à l'exclusion des cellules vivantes, des composés animaux ou végétaux non dégradés ou incomplètement dégradés (appartenant aux zones superficielles appelées litières). Chimiquement, l'humus renferme des unités alkyles et aromatiques pontées par des atomes d'oxygène et des groupes azotés, portant des groupes fonctionnels, dont les principaux sont des carboxyles, hydroxyles, carbonyles, unités phénoliques et quinoniques. L'humus est donc à la fois hydrophile et hydrophobe, joue un rôle important dans le transport des métaux et des hydrocarbures dans l'environnement. L'humus contracte des associations étroites par cations interposés avec les constituants minéraux du sol comme les argiles. Après extraction par la soude diluée ou le pyrophosphate 0,1 M, on distingue trois fractions de base en fonction de leur solubilité : les humines insolubles (résidu après extraction), les acides humiques insolubles à pH < 2 (précipitables à l'acide), et les acides fulviques solubles à tous les pH. L'humus dans son ensemble correspond à une partie résiduelle plus ou moins récalcitrante après l'attaque microbienne des matières végétales, polyphénolique et quinonique, progressivement oxydée et polymérisée de façon anarchique. La filiation évolutive est : acides fulviques $\rightarrow$ acides humiques $\rightarrow$ humine. Elle s'accompagne d'une polymérisation accrue et d'un ensemble de transformations qui dépend de la nature du couvert végétal et du climat. L'humus du sol se caractérise par une durée de vie très longue, qui est de plusieurs années, voire de plusieurs siècles. Dans les sols biologiquement les plus actifs, l'humine se lie aux argiles, intervient dans les propriétés absorbantes du sol, le gonflement, l'échange d'ions et la texture générale en agrégats. Les sols moins actifs au contraire, où l'évolution est moins poussée, ont moins d'agrégats, davantage de produits peu polymérisés et acides qui complexent facilement les métaux, et sont corrosifs sur les roches dont l'altération est accélérée. Les spécialistes des sols distinguent plusieurs catégories et niveaux d'humus en fonction du climat, de la couverture végétale, de la roche environnante et du taux d'aération. La tourbe est un humus particulier plus ou moins acide, engendré en milieu non aéré. Voir Tourbe.

Hybridation (entre acides nucléiques) **-** Association par ponts hydrogène entre les bases de deux chaînes nucléiques monocaténaires, comportant une complémentarité de séquence. L'hybridation peut se faire entre ADN et ADN, ADN et ARN, ARN et ARN. Dans les conditions opératoires, l'hybridation avec un ADN s'obtient après dénaturation de celui-ci en brins séparés, et peut se réaliser entre séquences imparfaitement complémentaires. L'hybridation entre ADN et sondes (court polydésoxyribonucléotides de synthèse) essentielle dans la recherche des gènes et la méthode d'amplification dite PCR.

Hydratase - Enzyme catalysant l'addition d'une molécule d'eau sur la liaison insaturée.

Hydrate de méthane - Matière grisâtre et poreuse, formée sous pression à partir de méthane et d'eau, et formant des accumulations considérables dans les sédiments océaniques profonds. Instable sous pression atmosphérique, laisse échapper du méthane à raison de 160 cm^3 de gaz environ par cm^3. Source potentielle d'énergie quand les problèmes pratiques liés à son exploitation auront été résolus.

Hydrogénase - Catalyse la réaction : $H_2 + 2e^- \leftrightarrow 2H^+$. L'accepteur ou le donneur d'électrons est généralement une ferrédoxine. Toutes les hydrogénases *stricto sensu* contiennent des centres fer-soufre, sauf exceptions rencontrées parmi les méthanogènes. Elles fonctionnent en consommant de l'hydrogène (*uptake hydrogenases*), ou en le produisant. Propriétés caractéristiques : coupure hétérolytique de l'hydrogène moléculaire en un proton et un hydrure, catalyser un échange H_2/H^+, réduire avec H_2 des colorants à bas potentiel (viologènes), être sensible à O_2. Dans le premier cas, l'échange est mesurable en présence de gaz deuterium (D_2) par la formation de HD. Le rapport H_2/HD dépend des hydrogénases

en fonction de leur effet isotopique (choix de H par rapport à D). Dans le second cas, on peut mesurer la production de H_2 (à l'abri de l'oxygène) avec le méthylviologène réduit, ou sa consommation par le même colorant oxydé. Les hydrogénases consommant H_2 dans le périplasme ou sur la face externe de la membrane cytoplasmique, contribuent à former le potentiel membranaire en libérant des protons et participent ainsi à la conservation de l'énergie cellulaire. Les hydrogénases dites à [Fe] sont très sensibles à O_2, ont deux atomes de fer à leur site actif liés par des ligands inhabituels tels que CO et CN^-, des centres [4Fe-4S] et produisent H_2 dans les fermentations. Les hydrogénases consommatrices de H_2 ou *uptake hydrogenases*, à [Ni-Fe], renferment une chaîne intramoléculaire de noyaux [4Fe-4S] et un centre bi-métallique contenant du nickel et du fer, relié aussi parfois à CO et CN^-. Certaines d'entre elles, à [Ni-Fe-Se], renferment aussi du sélénium dans la sélénocystéine. Répandues dans les eubactéries (sulfato-réductrices, phototrophes) et les archaebactéries. Depuis quelques années, les connaissances sur les hydrogénases ont rapidement progressé. Une revue très complète à consulter est celle de VIGNAIS PM & COLBEAU A (2004) *Curr. Issues Mol. Biol.* vol.6, qui était en cours de parution au moment où ce livre était chez l'éditeur.

Hydrogénosomes - Organites intracellulaires d'environ 1 µm, productrices de H_2 à l'aide d'une hydrogénase. Leur morphologie rappelle les mitochondries. On les trouve dans des protozoaires (des trichomonades, certains ciliés) et des champignons adaptés à la vie anaérobie. Dans le cilié *Nyctotherus ovalis* vivant dans le milieu quasi anaérobie du tube digestif de blattes, on observe associés à des méthanogènes endosymbiotiques de nombreux hydrogénosomes qui ont conservé des caractères mitochondriaux et un génome résiduel (AKHMANOVA et coll. (1998) *Nature* **396** : 527-528). Une hydrogénase est codée par l'ADN nucléaire. Dans d'autres cas, les hydrogénosomes sont entièrement dépourvus d'ADN. Les divisions se font de façon autonome, sous le contrôle de gènes qui sont tous dans le noyau. Origine problématique.

Hydrogénosulfite réductase - Voir Sulfite réductase. L'ion HSO_3^- prédomine sur SO_3^{2-} en milieu aqueux à pH neutre.

Hydrogénotrophe - Organisme utilisant l'oxydation de H_2 comme source d'énergie.

Hydrolase - Enzyme catalysant une hydrolyse, commandée par le caractère nucléophile de l'ion hydroxyle OH^-, et conduisant à la rupture d'une liaison.

Hydroxylamine oxydoréductase - (EC 1.7.3.4) ou hydroxylamine oxydase, fait partie de la nitrification. Catalyse l'oxydation à 4 électrons de l'hydroxylamine en nitrite. $NH_2OH + O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + H^+$. Chez *Nitrosomonas europaea*, protéine trimérique contenant 7 hèmes c et un hème P460 (hème c lié à la protéine par un lien covalent supplémentaire, à ne pas confondre avec l'hème d'un cytochrome P450). Le P460 réduit peut lier O_2, CO ou H_2O_2. La structure de l'enzyme a été déterminée par rayons X. Une enzyme similaire existe chez un méthylotrophe (*Methylococcus capsulatus*).

Hydroxylation - Apport d'un hydroxyle sur un accepteur organique. C'est le plus souvent le résultat d'une oxygénation, l'atome d'oxygène provenant de O_2. Elle survient également par addition d'une molécule d'eau du solvant sur une double liaison. La réaction est alors désignée comme une hydratation, catalysée par une hydratase. Diagnostic expérimental par oxygène-18.

Hyperthermophile - Thermophile extrême : micro-organisme dont la température optimale de croissance est au-dessus de 80°C. Les bactéries hyperthermophiles sont généralement des archaebactéries appartenant à 3 groupes, les méthanogènes (*Methanopyrus*, *Methanococcus*, *Methanothermus*), des sulfato-réducteurs comme *Archaeglobus*, des soufre-dépendants ou sulfothermophiles (*Pyrodictium*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*). La plupart ont besoin de la réduction du soufre élémentaire en H_2S pour croître. Tous contiennent une gyrase inverse, qui induit des super-tours positifs dans l'ADN et accroît sa résistance à la dénaturation. Autres modifications : composition de la membrane, certaines propriétés au niveau de la transcription des gènes, thermostabilité accrue des enzymes consolidées par des zones hydrophobes, importance de protéines stabilisatrices (chaperons moléculaires). L'optimum de *Pyrococcus furiosus* est de 100°C avec un temps de doublement d'une demi-

heure, est hétérotrophe, croît jusqu'à 103°C et résiste à 110°C. Les hyperthermophiles sont souvent des barophiles, et une augmentation de pression peut augmenter leur optimum de croissance de plusieurs degrés. On trouve aussi des hyperthermophiles en biotope terrestre chaud et acide près des solfatares (pH 1-3), ou alcalin près des geysers et sources alcalines. On a caractérisé dans plusieurs espèces des tungsto-enzymes (voir Tungstène).

Hyphes - Filaments tubulaires et souvent ramifiés formant le corps végétatif de nombreux champignons. Les bactéries du groupe des Actinomycètes élaborent des filaments d'aspect similaire.

Hyphomicrobium - Voir Prosthèque.

IHF - *Integration Host Factor*. Protéine trouvée à l'origine comme nécessaire à l'intégration du propage Lambda dans le génome du colibacille. Sa fonction serait double, en participant avec HU à l'enroulement compact de l'ADN dans la bactérie (nucléoïde), en contribuant spécifiquement au contrôle de la transcription de divers gènes. L'IHF se lie à l'ADN sur une séquence consensus spécifique en y imposant une forte courbure de l'ordre de 140°. C'est un hétérodimère faisant partie de la même famille que HU (voir HU) et fait partie d'une famille souvent désignée comme *histone-like proteins*. Chez les Gram-négatifs, IHF participe à la régulation de gènes variés, en particulier ceux du métabolisme azotés commandés par le facteur d'amorçage sigma-54, de la synthèse d'alginate chez *Pseudomonas aeruginosa*, de la synthèse des flagelles chez *Caulobacter*, de la voie haute de dégradation du toluène dans la plasmide TOL de *Ps. putida*. Voir CALB R et coll. (1996) *J. Bacteriol.* **178** : 6319-6326.

Îlots de pathogénécité - Voir Pais.

Incompatibilité (plasmides) **-** Il y a incompatibilité entre deux plasmides quand ils ne peuvent coexister de façon stable dans le même hôte, parce que leur réplication obéit au même système de contrôle. Les plasmides peuvent donc être classés en fonction du système *Inc*.

Inducteur - Composé dont la présence dans la cellule déclenche le phénomène d'induction.

Inducteur gratuit - Inducteur non transformé par les protéines synthétisées après induction.

Induction - Mécanisme régulateur se traduisant par l'accélération de la transcription en ARN messager d'un ou plusieurs gènes sous l'effet d'un inducteur, qui est reconnu par un répresseur lié spécifiquement à l'ADN en un site opérateur (voir Répresseur, Répression).

Inhibiteur compétitif - Composé non transformé par une enzyme mais capable de prendre la place du substrat dans son site catalytique. Pour être reconnu par le site, l'inhibiteur présente donc une certaine ressemblance chimique ou structurale avec le substrat normal. Comme le substrat et l'inhibiteur s'excluent mutuellement sur la protéine, il en résulte une compétition qui ralentit la réaction. Ce ralentissement est faible ou quasi nul si le substrat est en grand excès sur l'inhibiteur, mais l'efficacité de celui-ci dépend de la constante de dissociation Ki du complexe enzyme-inhibiteur. Une constante Ki faible correspond à une forte affinité de la protéine pour l'inhibiteur et une plus grande sensibilité à celui-ci. Dans le cas particulier des analogues de l'état de transition, la structure de l'inhibiteur imite un état de transition plutôt que le substrat intact. Un analogue de l'état de transition est généralement reconnu avec une affinité très forte et exerce une inhibition très efficace.

Inhibiteur suicide - Expression désignant couramment un inhibiteur de type compétitif (reconnu par site spécifique) contractant une liaison covalente à caractère définitif avec la protéine et conduisant à son inactivation permanente.

Inipol EAP22 - Micro-émulsion lipophile contenant de l'urée dissoute dans une saumure et encapsulée dans de l'acide oléique et du lauryl-phosphate. Produit développé par Elf-Aquitaine et expérimenté après le naufrage de l'*Amoco Cadiz*.

Insertion - Mutation génétique liée à l'introduction d'un ou plusieurs nucléotides dans la séquence d'ADN.

Insertion (séquences d') **-** Les séquences d'insertion (IS) sont des éléments transposables présents chez les eucaryotes et les procaryotes, segments d'ADN capables de s'insérer ou de s'exciser en des points spécifiques du génome. Chez les bactéries Gram-négatives, les IS

ont une longueur de 0,7 à 1,5 kb. *E. coli* en contient d'assez nombreux appartenant à une dizaine de types différents. Cette situation est apparemment très commune. Les IS sont responsables d'une certaine variabilité des souches, modifient leurs propriétés en apportant parfois des promoteurs supplémentaires ou de nouveaux sites de régulation qui ont pour effet de changer le taux d'expression des gènes en fonction des conditions physiologiques, ou même de les inactiver.

Interactions π - Liaison non covalente tendant à empiler deux cycles aromatiques l'un sur l'autre, par transfert de charge. Revient pour les deux cycles à échanger un électron π dans un sens ou dans l'autre (voir Aromatique). Deux cycles aromatiques très voisins tendent donc à se disposer parallèlement l'un à l'autre comme deux assiettes. Ce facteur structural est important en environnement apolaire, dans les membranes ou dans l'organisation des protéines, entre certains acides aminés (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et divers cofacteurs ayant des cycles aromatiques.

Intégrase - Protéine contribuant à l'intégration d'un ADN dans un autre à la faveur d'une recombinaison, laquelle est en général spécifique du site. Exemples : intégrase du virus Lambda catalysant l'intégration de l'ADN dans le génome bactérien sous forme de prophage, intégrase liée au fonctionnement d'un intégron.

Intégron - Structure génétique de base comportant le gène d'une intégrase, une séquence de 59 bp autorisant des recombinaisons et un promoteur. On suppose que cette structure a été à l'origine d'une famille de transposons de différentes tailles (Tn21), par intégrations successives de segments supplémentaires (ou cassettes) porteurs de facteurs de résistance.

Intron - séquence intercalaire non codante dans un gène discontinu, transcrite en ARN mais éliminée par épissage au cours de l'élaboration de l'ARN messager définitif (végétaux, levures, animaux, certaines archaebactéries).

IR - *Inverted repeats* ou répétitions inversées. Petites séquences se trouvant aux extrémités d'un élément d'insertion (IS). On distingue les IR gauche et droite : IRL et IRR.

IRMS - *Isotope Ratio Mass Spectrometer*. Spectrométrie de masse destinée à évaluer les rapports isotopiques d'éléments légers (H, C, N, O, S) dans des molécules gazeuses : H_2, CO_2, CH_4, N_2, SO_2). La méthode comporte l'injection du mélange gazeux, la conversion en ions des molécules injectées par un bombardement ionique, leur accélération et focalisation par un champ électrique, une séparation en fonction de leur masse dans un champ magnétique, un détecteur pour déterminer l'intensité des différents faisceaux ioniques après séparation.

IS - Séquence d'insertion. Voir Insertion (séquences d'), Transposon.

Iso-enzymes - Lorsque deux enzymes élaborées par un même organismes catalysent la même réaction mais sont séparables expérimentalement par électrophorèse ou chromatographie, on dit que ce sont des iso-enzymes. Il existe une variété de situations. Voici les trois principales :

- Les enzymes sont codées par des gènes distincts, mais conservent une parenté structurale généralement importante qui traduit une origine évolutive commune.
- Les enzymes sont codées par le même gène, mais certaines molécules d'ARN messager ont perdu un segment (intron) qui est conservé dans d'autres : les polypeptides formés après traduction n'ont pas tous la même longueur (épissage différentiel de l'ARN).
- Les enzymes sont codées par le même gène, mais certains polypeptides sont soumis à des modifications secondaires (acétylation, oxydation, phosphorylation, rupture hydrolytique en certain(s) point(s) de la chaîne…), ce qui a pour effet de créer des molécules qui présentent de petites différences de structure et de propriétés.

Isoflavonoïdes - Voir flavonoïdes.

Isoforme - Souvent cité dans la littérature comme synonyme d'iso-enzyme.

Isoprénoïde - Composé à structure d'hydrocarbure insaturé correspondant à la répétition d'unités en C5 ramifiées, assemblées à partir d'unités de 5 atomes de carbones apportées sous forme d'esters diphosphate. Le premier terme de la série est le diméthylallyl-diphosphate condensé plusieurs fois avec l'isopentényl-diphosphate (IPP) pour donner des

chaînes renfermant un multiple de 5C et divers constituants importants, comme indiqué par la figure.

OPP → OPP → OPP → ···
IPP OPP IPP IPP

C 5	Diméthylallyl-diP	Cytokinines
C 10	Géranyl-diP	Monoterpènes
C 15	Farnesyl-diP	Stéroïdes, cholestérol, sesquiterpènes, protéines farnésylées, hèmes A,O, Vitamine K2. Avec allongement et liaisons *cis* : caoutchoucs
C 20	Géranylgéranyl-diP	Caroténoïdes, rétinoïdes, diterpènes, protéines géranylgéranylées, chlorophylles et bactériochlorophylles, idem caoutchoucs avec des liaisons *cis*, lipides des archaebactéries
C 25	Géranylfarnésyl-diP	Lipides des archaebactéries
C 30	Hexaprényl-diP	Ubiquinone 6, naphtoquinone 6
C 35-50	Polyprényl-diP	Ubiquinones 7-10, naphtoquinones 7,10
C > 50	Gommes	Gommes végétales, Gutta percha (C > 500-3000)

Isotopes - Différentes formes d'un même élément chimique comportant le même nombre de protons et d'électrons, mais un nombre de neutrons différents.

Isotopique (Effet) **-** Modification de la vitesse d'une catalyse enzymatique obtenue dans certains cas en remplaçant un atome du substrat par un isotope. Exemple : remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome de deutérium.

Isotopique (Déviation) **-** Voir Fractionnement isotopique.

ISP - *Iron Sulfur Protein*.

Katal - Unité d'activité enzymatique, transforme une mole de substrat par seconde. Dans la pratique, on utilise plutôt les micro- et nanokatals.

Kb - Kilobase. 1 kb = 1000 paires de bases (1000 pdb), unités de longueur sur l'ADN. Le pas de la double hélice est proche de 10 pdb.

Kérogène - Ensemble de produits insolubles et polymérisés transformés au cours des périodes géologiques, provenant de la matière organique enfouie dans les sédiments marins ou lacustres. La transformation en profondeur sous pression et élévation de température a provoqué croît-on une fragmentation en résines, asphaltènes et divers hydrocarbures retrouvés dans le pétrole brut.

Kinase - Catalyse une phosphorylation avec l'ATP comme donneur, libérant de l'ADP.

K_m (Coefficient) **-** Dans le cas d'une enzyme obéissant à la loi de MICHAELIS, c'est la concentration d'un substrat limitant donné pour laquelle la vitesse de la réaction catalytique est la moitié de la vitesse maxima théorique (les autres facteurs n'étant pas limitants). Le taux d'enzyme est lui-même un facteur limitant. Le K_m pour un substrat est généralement indiqué en molarité. Il est proche de la constante de dissociation du complexe formé réversiblement entre l'enzyme et son ligand. Il est d'autant plus faible que l'affinité de la protéine pour celui-ci est plus forte. Le K_m se détermine par extrapolation graphique en dosant la vitesse de la réaction avec différentes concentrations de substrat, tous les autres facteurs étant constants. La gamme de valeurs observées selon les systèmes enzymatiques va le plus souvent de 1 µM à 2-3 mM. Voir MICHAELIS.

Koc (et **log Koc**) **-** Le Koc d'un contaminant est le coefficient de partage entre la phase organique fixée sur les particules du sol et la phase libre. Le Koc est caractéristique de chaque contaminant, et est relié à son hydrophobicité. On mesure celle-ci en agitant le contaminant dans un mélange constitué à parts égales d'octanol et d'eau. Après séparation

des deux phases, le coefficient de partage ou Kow est la proportion entre la partie dissoute dans l'octanol par rapport à l'eau. Une relation fait dépendre le Koc de ce partage Kow. Par exemple pour divers composés aromatiques, log Koc = log Kow – 0,21. Les contaminants à Koc élevé ont davantage tendance à s'adsorber aux particules du sol.

Kow - Coefficient de partage octanol/eau : voir Koc.

KRAFT (procédé) **-** Technique industrielle utilisée dans la fabrication des pâtes papetières dites chimiques, consistant à éliminer une grande partie de la lignine du bois. Pour extraire une tonne de lignine, il faut environ 800 kg de soude et 300 kg de sulfure de sodium. A défaut d'une opération de blanchiment, qui élimine la lignine résiduelle, le papier jaunit progressivement à la lumière (c'est le cas du papier journal). Le blanchiment conduit par divers réactifs (ClO_2, O_3, CO_2...) tend à libérer des substances polluantes pour l'environnement.

Laccases - *p*-Diphénol oxydases extracellulaires (EC 1.10.3.2) des champignons et des plantes, beaucoup plus rarement des procaryotes (*Azospirillum*). Les laccases réduisent O_2 en H_2O par un mécanisme à 4 électrons. Elles sont impliquées chez les plantes dans la morphogénèse, dans le développement et dans le métabolisme de la lignine, elles font aussi partie des facteurs de virulence dans certains champignons pathogènes. Ce sont des glycoprotéines contenant 2 à 4 Cu par molécule, dosables à 525 nm par oxydation de la syringaldazine à pH modérément acide. Elles produisent des quinones et semiquinones, et sont des inhibiteurs de la chaîne respiratoire. Les laccases se distinguent des tyrosinases qui sont des monophénol mono-oxygénases (EC 1.18.14.1) et des o-diphénol oxydases (EC 1.10.3.1). Les laccases à 4 Cu ont à la fois un Cu de type I, un Cu de type II, et un groupe bi-métallique de type III (voir Cuivre).

Lactone - Ester interne né de la réaction d'une fonction acide et d'une fonction alcool portées par la même molécule. Exemple : gluconolactone formée après oxydation en acide de la fonction aldéhydique du glucose.

Lagunage - Procédé d'auto-épuration des eaux usées, fondé sur les processus naturels de biodégradation et de recyclage des polluants en biomasses bactériennes, végétales et animales. Le lagunage est pratiqué dans des bassins peu profonds à l'air libre, traversés par les eaux polluées. Il peut s'appliquer aussi bien aux effluents urbains qu'aux eaux très polluées par le lisier de porc. Il tend vers des applications valorisables, comme l'élevage en masse de daphnies, l'élevage de poisson ou la production de végétaux qui seront ultérieurement enfouis dans les sols comme fertilisants. L'épuration par lagunage est souvent facilitée par le développement très rapide de végétaux verts flottants pouvant former un tapis continu : *Lemna minor* et *Lemna gibba* (lentilles d'eau), *Eichornia crassipes* (jacinthe d'eau), *Pistia stratiotes* (laitue d'eau). Les lentilles d'eau constituent un excellent engrais vert, facile à récolter, la production pouvant dépasser 70 tonnes de végétaux frais par hectare. La décomposition anaérobie des jacinthes d'eau en milieu tropical est une source de méthane utilisable à des fins domestiques. Le lagunage permet aussi une production de larves chironomes (vers de pêche) et de zooplancton (daphnies).

Latérites - Désignent plusieurs types de sol tropical de couleur rouge par l'abondance du fer, formant à la surface du sol une croûte de consistance analogue à celle du béton. La formation des latérites est caractéristique des pays chauds et humides, et s'explique par une évaporation superficielle intense facilitant la remontée et l'accumulation des silicates d'alumine et des oxydes métalliques des couches plus profondes. L'apparition des latérites peut rendre irréversible la dégradation de la végétation due au déboisement, rend les sols impropres à l'agriculture, facilite les dévastations par ruissellement après de fortes pluies.

Lectine - Protéine végétale de surface capable de lier spécifiquement et avec une haute affinité un motif glucidique ou un chaînon glucidique (polysaccharide), libre ou placé à la surface d'une cellule. Une lectine peut participer à un mécanisme de reconnaissance de cellule à cellule. Terme étendu fréquemment à des protéines animales montrant des propriétés comparables.

Leghémoglobine - Hémoglobine particulière (Leg pour légumineuse) synthétisée par les plantes (l'hème étant fourni par les bactéries) au niveau des nodules racinaires où sont logées les bactéries symbiotiques assimilatrices de N_2. La protéine piège O_2 à taux élevé

avec une forte affinité et le restitue à taux faible, comme le fait l'hémoglobine animale. Des hémoglobines à forte affinité pour O_2 se rencontrent dans différents tissus des di- et monocotylédones indépendamment de toute symbiose, leur fonction physiologique n'étant pas bien cernée.

LEWIS (Acides et bases de) - Un acide de Lewis est une substance dont l'un des éléments a une couche électronique vide ou incomplète, agit comme accepteur d'électron(s). Un acide de BRÖNSTED, ou donneur de proton, est aussi un acide de Lewis dans le sens où acceptant un électron, il libère H^+ et forme avec la charge supplémentaire un anion. Un métal se comporte généralement comme acide de Lewis. Inversement une base de Lewis est un donneur d'électron(s) ou de doublet électronique, accepte volontiers un proton (base de BRÖNSTED) et a une réactivité nucléophile. Une addition entre acide et base de Lewis peut former une liaison de coordinence.

LH (Complexes) - *Light-harvesting*. Complexes contenant un agencement de polypeptides spécifiques et de pigments associés, dits antennaires, participant à la collecte de l'énergie lumineuse chez les phototrophes. Chez les bactéries phototrophes, les complexes LH-1 entourent directement le centre réactionnel. Le dispositif est parfois entouré par des complexes LH-2.

Lichen - Organisme constitué par l'association symbiotique entre une algue type *Trebouxia* ou une cyanobactérie (exemple : *Nostoc*) avec un champignon (souvent un ascomycète).

Ligand - Terme anglo-saxon très utilisé pour désigner un atome ou un groupe d'atomes venant s'attacher réversiblement, en un site spécifique, sur une protéine. Le ligand d'une enzyme diffère d'un substrat en ce qu'il n'est pas transformé par elle, et peut être un inhibiteur compétitif.

Ligases - Terme désignant les enzymes de classe 6, qui ont en commun d'effectuer une synthèse endergonique couplée à la consommation d'une molécule d'ATP, hydrolysée en AMP et pyrophosphate. Ces enzymes sont aussi appelées synthétases, par opposition aux synthases, qui créent également une liaison entre deux molécules mais sans couplage énergétique.

Lignine - Polymères tridimensionnels amorphes formés par l'association non répétitive et en proportions variables de trois unités monomères : les alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique. La complexité de la lignine vient de la grande diversité de ses liaisons, de son hétérogénéité, et des liaisons contractées avec d'autres polymères tels que les glucides de la paroi végétale. La synthèse de la lignine résulte d'une branche métabolique particulière issue de la phénylalanine, qui est en même temps le précurseur de nombreux produits végétaux impliqués dans la protection, la pigmentation et les communications chimiques. Les différentes méthodes d'isolement des lignines comportent des étapes de broyage des copeaux de bois et des extractions laborieuses par le dioxane ou le tétrahydrofurane consistant à éliminer la partie glucidique, mais provoquent certaines altérations comportant à la fois des fragmentations et des repolymérisations. Une méthode dite de "bois explosé" consiste à chauffer les copeaux en présence de vapeur d'eau à haute pression à plus de 200°C, et à provoquer une détente adiabatique brutale qui a pour effet de déstructurer complètement les fibres et d'empêcher les molécules de lignine de se condenser entre elles. La lignine obtenue est commode pour de nombreuses études mais il est pratiquement impossible d'obtenir une lignine purifiée "native". Malgré son insolubilité, la lignine (en particulier si elle est partiellement dégradée) peut être efficacement dissoute dans des solvants tels que le dioxanne ou des éthers couronne.

Lindane - γ-hexachlorocyclohexane. Insecticide à large spectre.

LiP - Peroxydases émise par des champignons (voir Pourriture blanche), oxydent des substrats à faible masse moléculaire comme le vériatraldéhyde, qui à son tour oxyde d'autres substrats et notamment la lignine.

Liposomes - Vésicules membranaires artificielles (bicouches ou multicouches), préparées à partir de phospholipides, dans lesquelles sont insérés des constituants choisis par l'expérimentateur. Les liposomes définissent un compartiment interne, dont la composition est également réglable.

Litho-autotrophe - Micro-organisme autotrophe tirant son énergie de l'oxydation d'une source non organique comme NH_3, H_2, les sulfures, Fe(II)...

Lixiviat - Effluent venant de la percolation des eaux de pluies à travers des déchets (décharges), entraînant des produits polluants et des composés nés de l'action biologique.

Luciférase - Enzyme catalysant l'oxydation d'une luciférine, avec émission de lumière. Chez *Vibrio* et *Photobacterium*, c'est une oxydoréductase flavinique et la luciférine est un aldéhyde (RCHO). L'oxydation utilise O_2 : $FMNH_2 + RCHO + O_2 \rightarrow FMN + RCOOH + H_2O$ avec émission de lumière (490 nm). Celle-ci est émise par un intermédiaire oxygéné de la flavine (FMNH-OOH) qui est réduite à nouveau par NADH. Chez les animaux le principe est différent. Les luciférines appartiennent à des types chimiques variés, la luciférase peut être une oxydase, une peroxydase ou une oxygénase. La lumière est émise alors par la luciférine oxydée, la luciférase peut exiger O_2, ATP et Mg^{2+} (*Photina*), ou n'exiger aucun cofacteur particulier.

Luciférine - Voir Luciférase.

Lyase - Enzyme catalysant sans oxydoréduction la formation ou la rupture d'une liaison entre deux atomes autres que l'hydrogène (classe 4 de la classification des enzymes).

Lysogénie - Propriété de certains bactériophages de se transmettre à l'état dormant dans la descendance des bactéries infectées sans les lyser. Cas les plus étudiés, le phage Lambda et le phage Mu (transposon). Seul entre dans l'hôte l'ADN du virus. L'ADN Lambda, au départ linéaire, se circularise, puis est intégré au génome bactérien en un point précis (*att*) sous forme de prophage. Celui-ci est transmis à la descendance pendant la phase lysogène comme un segment banal du génome. Le prophage contient trois catégories de gènes : les gènes des fonctions précoces (réplication de l'ADN, excision et remaniements du prophage), les fonctions tardives (protéines de l'enveloppe) et les gènes régulateurs. Ceux-ci, notamment le gène d'un répresseur, empêchent l'expression des deux catégories précédentes pendant la phase lysogène, mais provoquent leur induction au cours de l'entrée en phase lytique conduisant à l'assemblage de particules infectieuses dstinées à être libérées après destruction de la cellule.

LysR - Activateur des gènes de la synthèse de la lysine en présence de diaminopimélate, caractérisé chez *E. coli*. Voir aussi Activateur de transcription. LysR est le chef de file d'une importante famille de régulateurs positifs de transcription chez les procaryotes, partageant une similitude évolutive et plusieurs caractères :

- Ce sont des protéines de 276 à 334 acides aminés qui, en absence d'inducteur, se lient à l'ADN à l'état de dimères ou de tétramères, en amont des gènes régulés sur une séquence T-n_{11}-A à symétrie imparfaite (parfois G-n_{11}-A).
- Leur gène est exprimé à contre-courant à partir d'un promoteur qui chevauche en grande partie celui des gènes régulés. La plupart régulent leur propre synthèse qui est limitée automatiquement à un taux faible.
- En présence de l'inducteur, il y a changement des relations avec l'ADN, interaction avec l'ARN-polymérase et amorçage de la transcription en aval.

Magnésium - Métal nécessaire à la vie et abondant, sous forme d'oxyde ou de cations bivalents. Présent dans les chlorophylles, nécessaire à de nombreuses enzymes, notamment celles qui utilisent de l'ATP. Il y en a 1,29 g/L dans l'eau de mer, soit 8 fois moins que de sodium.

Mandélate - 2-hydroxy-3-phénylpropioniate.

Manganèse - Intervient dans les molécules biologiques sous forme Mn(II), Mn(III) et Mn(IV). La dernière forme correspond au degré d'oxydation du dioxyde de manganèse (MnO_2), abondant dans la nature et insoluble, mais réduit en anaérobiose par des espèces bactériennes. Inversement le Mn(II) est oxydé par de nombreuses bactéries de l'environnement. Le manganèse peut avoir un rôle structural. Mn(II) est un cofacteur de diverses enzymes où il agit comme un acide de LEWIS. Un cas particulier est celui des enzymes à cofacteur bimétallique comportant deux ions Mn(II) pontés par un atome d'oxygène : arginase, catalases à Mn, énolase, certaines exonucléases et des ARN catalytiques. Sur ce problème, voir DISMUKES CG (1992) *Chem. Rev.* **96** : 2909-2926. La fonction la plus spectaculaire du manganèse dans la biosphère est sans doute son association au PS2 de la photosynthèse

chez les végétaux, algues et cyanobactéries, où il intervient dans la photolyse de l'eau, et par conséquent dans la production de O_2.

Mangrove - Ecosystème particulier des pays tropicaux au niveau des rivages marins dans la zone intertidale, là où la température moyenne de l'eau est d'au moins 23°C. La végétation caractéristique des mangroves comporte des palétuviers, dont il existe une assez grande variété selon les régions du monde. Le terme de palétuvier désigne des arbres qui sont capables de vivre dans l'eau de mer peu profonde, là où elle se retire périodiquement par le jeu des marées, ont des racines aériennes assurant les échanges gazeux de la respiration aérobie, leurs tissus sont capables de repousser le sel et de l'excréter. Les mangroves des rivages continentaux sont soumises à des apports de sédiments et de fortes variations de salinité, car elles sont inondées à la fois par l'eau de mer et l'eau douce des fleuves. Les mangroves formées sur des hauts fonds subissent des variations de salinité dues à l'intense évaporation et à l'apport des pluies tropicales. Les racines en échasse des palétuviers hébergent une faune particulière, une très grande variété d'algues et de micro-organismes. Les mangroves sont souvent associées à des récifs coralliens lorsqu'il n'y a pas d'apport excessif de sédiments ou de remontée d'eau froide. Il s'agit généralement de milieux biologiques fragiles, dont l'équilibre est facilement menacé par l'activité humaine et les changements climatiques.

Mannanes - Polymères de mannose, présents dans les plantes et les levures. Les mannanes de levure contiennent une charpente principale d'unités de mannose liées en α-1,6 et des branches attachées en α-1,2 ou α-1,3.

Maturation - Phase terminale de la synthèse d'une macromolécule biologique, lui permettant d'acquérir son état définitif. Pour une protéine, elle peut concerner la mise en forme définitive ou l'assemblage des différentes sous-unités. Elle peut s'accompagner aussi de modifications de la structure covalente (acide nucléique, protéine) survenant après synthèse à l'état de précurseur, consister en coupure hydrolytique de la chaîne, phosphorylations, soudure d'un cofacteur… Voir aussi Chaperon moléculaire.

Mégaplasmide - Plasmide de grande dimension, de longueur supérieure à 100 kb.

Ménaquinones - Ou naphtoquinones. Quinones respiratoires, apparentées à la vitamine K_3 ou ménadione, de potentiel plus bas que celui des ubiquinones, et qui prédominent en métabolisme anaérobie ou dans la photosynthèse des cyanobactéries ou des plantes vertes. Elles se distinguent entre elles comme les ubiquinones par la longueur de leur chaîne latérale hydrophobe de type isoprénoïde. La phylloquinone, abondante dans les plantes, ou vitamine K_1, a une chaîne latérale phytyle (en C15). La farnoquinone ou vitamine K_2 a une chaîne farnésyle (en C20). La ménadione proprement dite n'a pas de chaîne latérale isoprénoïde.

Mésophiles - Organismes nombreux du sol dont l'optimum de croissance est entre 15 et 45°C, avec un optimum couramment situé de 20 à 40°C. Ne se développent plus au-dessous de 8°C.

Messager (ARN) **-** Voir Transcription.

Métallothionéines - Famille de protéines ayant en commun une faible masse moléculaire, une grande richesse en fonctions thiols (30% en cystéine, pas d'acides aminés aromatiques ni d'histidine), des séquences consensus Cys-x-Cys, et la capacité de fixer des métaux.

Méthanofurane (MF) **-** Cofacteur des méthanogènes, accepteur de formyle.

Méthanogène - Archaebactérie dont le métabolisme énergétique produit du méthane.

Méthanophénazine - Cofacteur membranaire d'oxydoréduction dans le passage du méthyl-coenzyme M au méthane.

Méthanotrophe - Organisme capable de se développer sur CH_4 comme seule source de carbone et d'énergie. Est en même temps un méthylotophe.

Méthionine (*L*-) **-** La méthionine est un acide aminé essentiel de la nutrition animale. Hormis sa fonction dans la construction des protéines, c'est en même temps un agent important du métabolisme mono-carboné, en particulier dans les méthylations. La méthionine synthase ajoute un méthyle sur la fonction thiol de la *L*-homocystéine à l'aide du méthyl-tétrahydrofolate

comme donneur. La structure de l'enzyme a été déterminée (CHISTOSERDOVA et coll. (1998) *Science* **281** : 99-102). L'enzyme fonctionne avec un corrinoïde, avec le Co(I) comme accepteur intermédiaire. La synthase s'inactive facilement par oxydation de Co(I) en Co(II). Elle est réactivée par une méthionine synthase réductase. La méthionine est potentiellement le donneur de méthyle dans la plupart des réactions de méthylations, le véritable donneur étant la S-adénosyl-méthionine (voir cette rubrique).

Méthylotrophe - Bactérie ou levure capable de se développer en utilisant du méthanol ou d'autres composés mono-carbonés comme seule source de carbone et d'énergie.

Méthylviologène - Colorant à bas potentiel redox (E'° = – 446 mV) utilisé expérimentalement comme accepteur d'électrons. Sa forme réduite n'est stable qu'en absence d'oxygène dissous. On peut maintenir un potentiel très bas par du citrate de titanium(III) comme donneur d'électrons artificiel (E'° = – 446 mV).

MF - Voir Méthanofurane.

MGD - Molybdoptérine-guanine-dinucléotide, cofacteur à structure dinucléotide trouvé dans les enzymes à molybdène (voir Molybdène), ou à tungstène (Voir Tungstène), lié à Mo.

Micas - Phyllosilicates composés de feuillets élémentaires de 0,1 nm d'épaisseur, comportant deux couches de tétraèdres SiO_4^{4-}, avec substitution partielle de Si par Al, encadrant une couche d'octaèdres. Les feuillets sont unis entre eux par des cations (K, Na, Mg, Fe...). La composition des micas va d'un pole magnésien à un pole ferreux . La biotite commune des granites contient Fe et Mg : $K(Mg,Fe)_3[Si_3AlO_{10}](OH,F)_2$. La biotite est souvent altérée en chlorite. La muscovite ou mica blanc a la composition : $KAl_2[Si_3AlO_{10}](OH,F)_2$.

MICHAELIS (loi de) : Ou loi de MICHAELIS-MENTEN. Si S est la concentration d'un substrat limitant et V_m la vitesse maxima atteinte dans les conditions de mesure, la vitesse observée est v (dans la même unité que V_m) dépend de S (Voir V_m et K_m). L'expression, valable dans les cas les plus courants, cesse de l'être pour les protéines dites allostériques. Son application est plus délicate en phase hétérogène (support solide), ou quand la diffusion du substrat vers l'enzyme introduit un facteur limitant (traversée d'une membrane).

Micro-aérophile - Organisme ayant besoin de O_2 pour sa croissance, mais ne pouvant supporter sa présence qu'à faible taux, par exemple à 1-5% du taux normal (air ambiant ou O_2 dissous à saturation dans l'eau).

Microcystines - Heptapeptides contenant des acides aminés non standards, libérés par dégénérescence cellulaire de cyanobactéries, inhibant l'acétylcholine estérase.

Microsomes - Particules membranaires obtenues après désintégration des cellules eucaryotiques, provenant des membranes cytoplasmiques : réticulum, GOLGI...

MK - Abréviation pour ménaquinone.

Minéralisation - Destruction complète d'une source organique en CO_2, H_2O, NH_3, sulfure, chlorure...

Mitomycine C - Antibiotique de la famille des aziridines, découvert dans *Streptomyces caespitosus*. Tranformé dans les cellules cibles par réduction et réarrangement, produisant un dérivé réactif bipolaire qui se lie de façon covalente à l'ADN en formant un pont entre les deux brins de la double hélice. Inhibe la réplication de l'ADN, bloque particulièrement la réplication des plasmides. Sert notamment à l'élimination des plasmides dans une souche bactérienne.

Mixotrophe - Organisme capable de se développer en assimilant simultanément du CO_2 et des composés organiques pour leurs synthèses carbonées.

MnP - Peroxydases émises par des champignons (voir Pourriture blanche), oxydent les ions Mn^{2+} en ions Mn^{3+}, qui à leur tour oxydent d'autres substrats et notamment la lignine.

Modulon - Ensemble des opérons commandés par une même protéine régulatrice. À la différence des régulons (voir Régulon), ces opérons correspondent à des fonctions physiologiques différentes, par exemple le contrôle du métabolisme azoté. Quand la distinction s'avère délicate, les auteurs préfèrent souvent parler prudemment de régulation globale.

Molybdène - Logé sous forme de molybdate (à l'état oxydé) dans un cofacteur d'oxydoréduction des molybdo-enzymes. La partie essentielle ou molybdoptérine a la structure d'un nucléotide modifié comportant un motif dithiolate, mais chez les eubactéries un autre nucléotide, contenant de la guanine ou une autre base, est soudé à la molybdoptérine formant le MGD. Fait exception à la présence d'un tel cofacteur la nitrogénase, où le molybdène est logé dans un noyau fer-soufre spécial. Des molybdo-enzymes ont une fonction essentielle chez les plantes et les micro-organismes, telles que la nitrate réductase, la xanthine oxydase, la sulfite oxydase et l'aldéhyde oxydase. La plupart des molybdo-enzymes renferment aussi un ou plusieurs noyaux fer-soufre et une flavine, ou encore un groupe héminique. On distingue en gros trois grandes familles de molybdo-enzymes. La première est celle de la xanthine oxydase renfermant la structure O=Mo=S et renferme des hydroxylases. Les enzymes de ce groupe sont facilement inactivées par l'ion cyanure, qui remplace le soufre par un deuxième groupe oxo et libère du thiocyanate. La seconde est représentée par la sulfite oxydase, avec la structure O=Mo=O. Une troisième est celle de la DMSO réductase. Le cofacteur MGD y est présent en deux exemplaires autour du molybdène, formant le *bis*(MGD)Mo. La formiate déshydrogénase et la nitrate réductase périplasmique appartiennent à ce groupe. Le remplacement du molybdène par du tungstène préserve ou supprime l'activité selon les cas, en provoquant une chute importante, de l'ordre de 300 mV, du potentiel redox.

Molybdoptérine - Voir Molybdène.

Mono-oxygénase - Enzyme utilisant O_2, catalysant la réaction générale (où A-H est un substrat) : $A\text{-}H + O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow A\text{-}OH + H_2O$. La source de deux électrons, NADH, NADPH ou vitamine C, est reconnue soit directement par l'enzyme (mono-oxygénases flaviniques) ou par l'intermédiaire d'une chaîne d'oxydoréduction (par exemple pour un P450). Les mono-oxygénases sont des hydroxylases, des époxydases ou catalysent une variété d'autres réactions. Leur cofacteur est du fer (héminique ou non héminique), du cuivre, une ptérine ou une flavine. Parmi les différentes méthodes de dosage utilisée, l'une d'elles consiste à mesurer à 340 nm la disparition de la bande d'absorption du NADH (ε_{340} = 6300 cm^{-1} M^{-1}).

Mössbauer (spectroscopie) **-** Basé sur un phénomène d'émission et d'absorption de photons gamma par des noyaux atomiques sans perte d'énergie due au recul de ces noyaux, sans perte de résolution due à leur agitation thermique. Concerne surtout le fer, l'étain et l'iode.

MPTH4 - Voir Tétrahydrométhanoptérine.

Mutagénèse dirigée - Changement par recombinaison artificielle d'une ou plusieurs bases à une position précise d'un gène. Ce procédé sert en particulier à obtenir le remplacement d'un acide aminé précis dans la séquence d'une protéine, de manière à observer les effets sur les propriétés de celle-ci. Par exemple remplacer un segment Val-His-Tyr par Val-Ala-Tyr dans un site actif.

Mutation - Modification du matériel génétique avec transmission définitive dans la descendance. Il y a plusieurs catégories.

- mutation ponctuelle dans une base, dont l'effet est de provoquer le remplacement d'un acide aminé par un autre dans une protéine ;
- insertion, par IS, transposon ou prophage ;
- inversion, délétion, duplication d'un segment de l'ADN, les cas les plus compliqués où interviennent des recombinaisons entre segments d'ADN ;
- changement du cadre de lecture ;
- apport d'un ADN étranger par transformation, conjugaison, transduction. Des phénomènes plus complexes s'ajoutent ou les remplacent chez les eucaryotes avec les remaniements et échanges parmi les chromosomes.

Mutualisme - Association obligatoire de deux organismes différents qui en tirent l'un et l'autre des conditions nécessaires à leur développement. Les démarcations ne sont pas toujours bien établies entre symbiose, symbiose mutualiste et mutualisme intégral. Dans le syntrophisme ou synergie, chaque partenaire peut se développer seul dans certaines conditions de milieu.

Mycelium - Ensemble des hyphes formant la partie végétative des champignons.

Mycobacterium - Forme les mycobactéries, Gram-positifs aérobies, en forme de bacilles ou de cellules filamenteuses. Leurs parois sont riches en lipides et ont des acides mycoliques, cires spéciales renfermant de 60 à 90 atomes de carbone (acides gras complexes ramifiés et hydroxylés). Caractérisées par leur coloration alcoolo-acido-résistante (la fuchsine acide n'est pas enlevée par un traitement alcool + acide). Certaines espèces sont saprophytes dans le sol, capables d'utiliser des hydrocarbures aliphatiques à courte chaîne ou des aromatiques, autotrophes facultatifs. D'autres espèces sont pathogènes : *M. tuberculosis* (source principale de la tuberculose humaine), *M. bovis* (tuberculose bovine), *M. leprae* (lèpre).

Mycorhizes - Champignons du sol étroitement associés aux racines des plantes. Il y en a deux sortes, les ectomycorhizes formant un manchon externe autour des racines, et les endomycorhizes qui y pénètrent. Les premiers sont souvent associés aux ligneux forestiers, les seconds colonisent au moins 80% des plantes cultivées. Les amanites, bolets et girolles sont les fructifications d'ectomycorhizes. Les lactaires sont auprès du pin sylvestre, les truffes auprès des noisetiers et chênes. Les champignons endomycorhiziens sont plus délicats à étudier. Leurs ramifications internes dans les racines forment ce qu'on appelle les arbuscules. Ils colonisent maints arbres tropicaux et d'autres, comme les érables, les gingkos et les séquoias. Il s'établit une sorte de symbiose entre le végétal et le champignon, avec échange de matériaux organiques ou minéraux. Le champignon aide à mobiliser dans le sol les phosphates, l'ammoniac, les débris végétaux, et même le potassium des feldspaths. Il n'assimile pas N_2, fonction réservée aux procaryotes. Les mycorhizes peuvent intervenir dans la répartition des plantes et leur compétition. Par exemple les conifères, qui n'ont pas les mêmes champignons que les plantes des alentours, peuvent rafler les éléments nutritifs à leur profit et faire le vide à leur contact immédiat.

Myxobactéries - Bactéries du sol Gram-négatives, caractérisées par leur mobilité qui se fait par glissement, et par un cycle biologique complexe où les cellules s'associent en nappe, se propagent par glissement d'ensemble, forment des fructifications au-dessus de la surface du sol, libérant des myxospores très résistantes à la dessiccation. Sécrétion d'enzymes digestives qui attaquent et lysent d'autres bactéries et les levures, synthèse d'antibiotiques. Utilisent des peptides et des acides aminés comme source de carbone, d'azote et d'énergie. Exemple très étudié - *Myxococcus xanthus*.

NADH-déshydrogénase - Assure le passage des électrons de NADH vers les quinones respiratoires au cours de la respiration, forment des complexes membranaires translocateurs de protons (type I) ou non translocateurs. Le type I renferme 14 sous-unités (*E. coli*), FMN et centres fer-soufre, se présente comme homologue du complexe mitochondrial des eucaryotes. Le type II est beaucoup plus simple, avec un seul type de sous-unité et FAD, sans fer-soufre, utilisé plus couramment chez les bactéries en aérobiose ou dans la dénitrification.

Nanoplancton - Organismes planctoniques de très petite taille, inférieure à 2 µm.

Naphtoquinones - Voir Ménaquinones.

Nappe phréatique - Si on creuse un trou assez loin dans le sol, on voit éventuellement le fond se remplir d'eau, qui se stabilise à un certain niveau : on vient d'atteindre la nappe phréatique.

NarL - Voir NarX/NarL.

NarQ/NarP - Fonctionne comme NarX/NarL.

NarX/NarL - Système régulateur à deux composants (capteur/activateur de transcription) répondant à la présence du nitrate ou du nitrite, commandant l'expression de divers gènes impliqués dans la dénitrification ou dans des voies de fermentation.

Nématodes - Vers microscopiques non segmentés abondants dans les sols et se nourrissant de plantes, animaux, champignons ou bactéries.

NERNST (loi de) **-** Relie le potentiel standard d'oxydoréduction de l'équilibre $Ox + n\,e^- \leftrightarrow Red$ en fonction des concentrations (ou activités) [Ox] et [Red] des formes oxydées et réduites : $E = E° + (RT/nF) \ln ([Red]/[Ox]$; $R = 8{,}314\ J.mol^{-1}.degré^{-1}$, $F = 95484$, n est le nombre

d'électrons transférés, T est la température absolue et les potentiels sont en volts. À 25°C et pour 2 électrons transférés, le potentiel à pH 7 est : E' = E'° + 0,0296 log ([Red]/[Ox]).

Nickel - Métal présent dans la CO déshydrogénase (acétyl-CoA synthase) dans un noyau Ni-Fe/S spécial, diverses hydrogénases (complexes Ni-Fe), le F430 des méthanogènes (un corrinoïde où Ni est au centre), enfin dans l'uréase.

NIH-shift (Déplacement NIH) **-** Mécanisme mis en évidence par marquage au deutérium, se traduit par le déplacement d'un atome d'hydrogène sur un oxyde aromatique. Le modèle est dans le passage de la phénylalanine à la tyrosine. L'époxyde en 3,4 formé par mono-oxygénation s'ouvre pour donner la fonction phénol en 4, tandis que l'hydrogène qui était en 4 passe en 3. Un mécanisme similaire a lieu dans la formation de l'homogentisate.

Nitracline - Niveau océanique (100-150 m de profondeur) séparant la zone superficielle où la concentration en nitrate est nanomolaire en ordre de grandeur, et la zone profonde où elle est près de mille fois plus élevée.

Nitrapyrine - (2-chloro-6-trichlorométhylpyridine). Inhibiteur covalent de l'ammoniac mono-oxygénase (nitrification), inhibe aussi la méthanogénèse, l'oxydation du méthane, la réduction du sulfate et la dénitrification. Attaquée en même temps de façon complexe par l'ammoniac mono-oxygénase en acide 6-chloropicolinique avec déshalogénation partielle (VANNELI T & HOOPER AB (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3597-3601).

Nitrate réductase - Chez les végétaux et micro-organismes, renferme du fer, du soufre et du molybdène, catalyse la réduction du nitrate en nitrite :

$$NO_3^- + 2\,e^- + 2\,H^+ \longrightarrow NO_2^- + H_2O$$

Nitrification - Oxydation naturelle de l'ammoniac (ammonium) en nitrate. Elle se fait en deux étapes principales, jusqu'au stade nitrite (la nitrification proprement dite) par des espèces telles que *Nitrosomonas europae*, *Nitrosococcus oceanus* ou *Nitrospira briensis*, puis par oxydation du nitrite en nitrate réalisée par les *Nitrobacter* et *Nitrococcus*. Ce sont des organismes chimio-autotrophes, qui tirent leur énergie des oxydations faites à partir de NH_3. Il existe aussi une nitrification hétérotrophe, par des espèces qui ont besoin d'une source carbonée organique pour se développer. C'est le cas de *Paracoccus denitrificans*, de certains *Pseudomonas* et autres espèces. Le passage de NH_3 au nitrite est catalysé par l'ammoniac mono-oxygénase et par l'hydroxylamine oxydase. La nitrification n'est pas exclusivement aérobie, et s'observe en O_2 limitant ou nul chez les espèces pouvant faire fonctionner simultanément une dénitrification. Un inhibiteur de la nitrification est l'allyl thiourée.

Nitrogénase - (EC 1.18.6.1) Enzyme fer-soufre exclusivement procaryotique, renfermant habituellement du molybdène (parfois du vanadium), catalysant la réaction :

$$N_2 + 8\,H^+ + 8\,e^- + 16\,ATP \longrightarrow 2\,NH_3 + H_2 + 16\,ADP + 16\,P_i$$

L'apport des électrons s'effectue typiquement par une ferrédoxine réduite. La nitrogénase est très sensible à O_2, et sa synthèse est réprimée lorsque le milieu contient de l'ammonium ou une source d'azote organique. Communément dosée par réduction de l'acétylène.

Nitroréductase - Enzyme réduisant le groupe azoté des nitro-aromatiques. Dans la classe I, l'enzyme est une oxydoréductase (EC 1.6.99.2) amenant le groupe azoté au stade de l'amine en utilisant NADH ou NADPH comme source d'électrons, et en fabriquant des intermédiaires nitroso ($–NO^•$) et hydroxylamino (–NHOH). Ces enzymes sont généralement des flavoprotéines et peuvent fonctionner en présence d'O_2. Le cofacteur est FMN chez les bactéries, FAD chez les mammifères. Dans la classe II, les enzymes bactériennes sont des NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases (EC 1.6.2.4) qui engendrent à partir du groupe nitro des radicaux anioniques. Ceux-ci s'oxydent par O_2 pour engendrer du superoxyde et redonner le substrat de départ selon un processus en circuit fermé. Ces nitroréductases sont sensibles au dioxygène et transforment le groupe nitro en amine dans les conditions anaérobies.

Noyau fer-soufre - Voir fer-soufre.

NtrA - Voir sigma-54.

NtrC - Désignée aussi comme GlnG, NRI (la nomenclature ne s'est stabilisée que récemment). Activateur de transcription sous forme phosphorylée, soit Ntr-P, impliqué dans le métabolisme azoté. La phosphorylation de NtrC se traduit par un changement de conformation analysé par RMN (KERN D et coll. (1999) *Nature* **402** : 894-898). Elle est catalysée par NtrB ainsi que sa déphosphorylation. Le couple NtrB/NtrC forme donc un système à deux composants d'un type particulier, où le transmetteur du signal, NtrB, est une protéine kinase quand elle est activée, une protéine phosphatase dans le cas contraire.

Nucléases de restriction - Endonucléases coupant les deux brins d'un ADN bicaténaire au niveau d'une courte séquence définie, de 4 à 7 pdb, très souvent symétrique. Les deux brins sont hydrolysés en des points décalés ou au même niveau selon les cas. Ce sont des enzymes de défense contre les ADN étrangers, et la bactérie protège son propre ADN par des enzymes de méthylation qui reconnaissent les mêmes séquences. Les nucléases de restriction utilisées en génie génétique appartiennent au type II, sans activité de méthylation associée. L'ADN est découpé en fragments de longueur déterminée pour chaque nucléase, et la séparation des fragments par électrophorèse permet d'établir ce qu'on appelle des cartes de restriction. Les fragments obtenus par EcoRI, qui reconnaît une séquence de 6 pdb, ont de l'ordre de 4 kb. Les nucléases reconnaissant 5 pdb font des fragments de 1 kb environ. Plusieurs découpages utilisant plusieurs nucléases sont pratiqués pour l'étude de zones déterminées de l'ADN. Les fragments sont séparés par électrophorèse sur agarose, récupérés sur filtre de nitrocellulose (*Southern blotting*). Les nucléases de restriction sont les premiers outils indispensables à l'analyse de génétique moléculaire.

OLAND - *Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification*. Conditions pauvres en oxygène où s'observent en même temps l'oxydation de l'ammoniac et la réduction des oxydes d'azotes par des organismes au moins en partie autotrophes.

Oligo-éléments - Eléments nécessaires au développement cellulaire mais dont l'apport est suffisant à dose faible ou très faible. Bore, calcium, cobalt, cuivre, fer, magnésium, manganèse, molybdène, nickel, sélénium, tungstène, vanadium, zinc. Les oligo-éléments entrent d'ordinaire dans la constitution de cofacteurs indispensables au fonctionnement de nombreuses enzymes, soit en tant que tels (par coordination par des groupes appartenant à la protéine), soit au sein de molécules organiques (coenzymes).

Oligomycine - Antibiotique inhibiteur de l'ATP synthase F_1F_0 au niveau de F_0.

Oligotrophe - Espèce pouvant se développer avec des taux très faibles d'éléments nutritifs.

OmpR - Protéine régulatrice de 27 kDa du colibacille, faisant partie d'une régulation à deux composants actionnée par la pression osmotique. Celle-ci règle le taux d'autophosphorylation de EnvZ, une protéine de la membrane interne de 45 kDa, dépassant dans le périplasme. EnvZ-P phosphoryle à son tour OmpR en OmpR-P, mais agit aussi comme déphosphorylase (phosphatase) sur cette dernière. Ces deux activités antagonistes sont probablement fondées sur deux états conformationnels de la protéine. OmpR est donc phosphorylée et déphosphorylée en permanence, mais le rapport OmpR-P/OmpR croît quand la pression osmotique s'élève. OmpR-P est à son tour un régulateur de transcription. En se fixant sur l'ADN en amont du gène de OmpF en un site de haute affinité, il active l'expression de ce gène. Cette action est renversée quand OmpR-P est abondant, car il y a alors fixation en plusieurs sites secondaires à faible affinité provoquant la répression de l'expression. Le taux de OmpF s'élève donc en pression osmotique faible, devient négligeable en pression forte. Mécanisme très étudié aux modalités complexes où d'autres fonctions cellulaires sont également contrôlées (voir aussi Porines, Régulations à deux composants).

Opéron - Ensemble de gènes adjacents sur l'ADN, transcrits dans le même sens à partir d'un promoteur commun (il peut y avoir des promoteurs secondaires dans l'opéron lui-même). Permet l'expression concertée des gènes qui le composent, placés sous l'influence d'un même régulateur, et correspond généralement à une fonction physiologique déterminée. Le groupement des gènes en opérons est un trait essentiellement procaryotique.

ORF - *Open reading frame*. Voir Cadre de lecture ouvert.

Origine (de réplication) - La réplication d'un réplicon (chromosome, plasmide…) commence toujours à une ou plusieurs zones précises du cercle (environ 245 bp chez *E. coli*), appelées origines de réplication.

Orthologues (Gènes) - Des gènes sont dits orthologues entre différentes espèces quand ils sont homologues par leur structure et la fonction qu'ils représentent.

Oxocarboxylate réductase - (2R)-hydroxycarboxylate-viologène-oxydoréductase. Réduit un 2-oxocarboxylate (R–CO–COO^-) en (2R)-hydroxycarboxylate avec donneurs probablement variés, dont des colorants réduits à bas potentiel. Large spécificité, bioptérine comme cofacteur, trouvé chez *Proteus vulgaris* (TRAUTWEIN et coll., (1994) *Eur. J. Biochem.* **222** : 1025-1032).

Oxydase - Enzyme oxydant un substrat à l'aide de O_2, lequel est réduit en H_2O_2 et (ou) en superoxyde dans le cas des oxydases flaviniques, en deux molécules d'eau par les oxydases respiratoires et les laccases. Les atomes d'oxygène ne sont pas incorporés dans le substrat (différence importante avec les oxygénases). Lorsque le produit de l'oxydation d'un substrat organique par une oxydase a incorporé un atome d'oxygène, celui-ci provient du solvant, et résulte de l'addition d'une molécule d'eau sur double liaison.

Oxygénase - Enzyme d'oxydoréduction utilisant O_2 pour introduire dans le substrat un atome d'oxygène (mono-oxygénase), ou les deux atomes à des endroits différents (dioxygénase). Un critère important pour démontrer l'oxygénation d'un substrat est l'introduction d'oxygène-18 dans le produit de la réaction à partir d'O_2 marqué avec cet isotope.

Oxygène singulet - Forme d'O_2 engendrée par excitation photochimique. L'oxygène diatomique ordinaire est un état triplet paramagnétique stable et relativement peu réactif, car c'est un bi-radical (**.**O–O**.**) contenant deux électrons non appariés et de spins parallèles. Dans l'oxygène singulet, très réactif et à vie brève, les spins sont en sens contraire.

OxyR - Protéine régulatrice de *E. coli* et *Salmonella typhimurium* activant sous forme oxydée la synthèse d'une gamme d'enzymes de résistance aux peroxydes, dont la catalase, la glutathion réductase, l'alkylhydroperoxyde réductase. OxyR commande un régulon dit du stress oxydant.

P450 (Cytochrome) - Enzyme héminique fonctionnant le plus souvent comme mono-oxygénase ou comme hydroxylase, époxydase, caractérisée par une bande d'absorption vers 450 nm à l'état réduit et en présence de monoxyde de carbone. Nécessite une source d'électrons (NAD(P)H + réductase), souvent un transporteur intermédiaire (ferrédoxine, cytochrome b_5). Les substrats sont majoritairement des hydrocarbures, des terpènes ou des stéroïdes. Le fer de la porphyrine est lié à la protéine par une coordination sur un groupe thiolate (cystéine). Les P450 peuvent aussi catalyser diverses réactions telles que des déshalogénations. Ceux des procaryotes sont des protéines solubles, membranaires chez les eucaryotes (notamment dans le foie des mammifères, chez les champignons et les plantes). Ces enzymes ont souvent une spécificité étendue, caractérisée par les variations de leurs spectres visibles et RPE en présence d'un substrat ou d'un inhibiteur comme la métyrapone ou le SKF 525A. L'analyse génomique révèle près de 80 gènes de P450 chez l'homme, et près du double chez les plantes comme *Arabidopsis*. Le sujet connaît une très grande extension grâce à la compilation de nombreuses séquences permettant d'établir un arbre évolutif. Les P450 sont maintenant classés en familles et sous-familles. Ils sont désignés par le sigle CYP suivi d'une lettre, indiquant la sous-famille, et d'un numéro d'ordre. Le règne végétal renferme de très nombreux P450 affectés au métabolisme secondaire : synthèse d'auxines, de pigments, de facteurs de défense. Certains sont atypiques, ne font pas d'hydroxylations, utilisent le peroxyde au lieu de l'oxygène et peuvent utiliser la source d'électrons sans transporteurs intermédiaires.

PABA - Acide *p*-aminobenzoïque, facteur de croissance dont la structure est imitée par les sulfamides. Précurseur de la synthèse de l'acide folique et du FH4.

PAH - Voir HAP.

Pais - *Pathogenecity island*, ou îlot de pathogénécité. Série de gènes groupés sur une longueur d'ADN parfois assez grande (plus de 30 kb, jusqu'à 200 kb) chez les bactéries

Gram-positives et négatives, présente dans les souches pathogènes et absente des souches non virulentes. Le contenu en G + C peut être différent de celui du reste du génome. Aux bornes d'un Pais s'observent fréquemment des séquences spéciales telles que des IS et des gènes codant pour des ARNt. On trouve dans ces îlots des vestiges de gènes corrrespondant à des intégrases et des facteurs de flexibilité du génome ressemblant à ceux qu'on trouve dans les plasmides et les phages, suggérant que les Pais ont pu avoir pour origine d'anciens plasmides ou phages intégrés. Les Pais de souches uropathogènes (*E. coli*, *Yersinia* spp., *Helicobacter pylori)* ont tendance à subir des délétions, ou au contraire une amplification, et renferment des traces de séquences laissant supposer des transferts et propagations fréquents, en particulier par des bactériophages. Les îlots de pathogénécité sont souvent génétiquement instables (HACKER J, BLUM-OEHLER G, MUHLDORFER I & TSCHAPE H (1997) *Mol. Microbiology* **23** : 1089-1097).

PAPS - Phosphoadénosine phosphosulfate. Intermédiaire dans la réduction assimilatrice du sulfate en sulfite, comme l'APS avec un phosphate supplémentaire en position 3' du ribose.

Paralogues - Protéines homologues adoptant le même type de conformation mais ayant des fonctions différentes. L'évolution des gènes paralogues est considérée comme une source importante d'apparition de nouvelles protéines et de diversification des voies métaboliques.

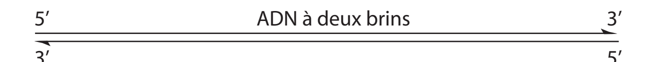
Paroi végétale - Les cellules des plantes supérieures sont entourées d'une paroi constituée de polysaccharides où dominent initialement des hémicelluloses et substances pectiques, accompagnées d'une petite proportion de cellulose, et formant la paroi primaire. Cette paroi reste flexible, participe au réglage de la croissance cellulaire, contient des enzymes qui assurent ses remaniements et son allongement au cours de la croissance cellulaire. La paroi primaire renferme des glycoprotéines spéciales dont certaines d'entre elles ou HGRP (*hydroxyproline-rich glycoprotein*), se caractérisent par l'abondance de proline hydroxylée rappelant les collagènes des animaux. Ces HGRP sont émaillées d'oligosaccharides renfermant de l'arabinose (A. HEREDIA et coll. (1995) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **200** : 24-31). Au cours d'un processus appelé parfois secondarisation, la paroi s'épaissit du côté intérieur par le dépôt de fibres de cellulose et atteint ses dimensions définitives. Cette nouvelle paroi dite secondaire, à dominante cellulosique, se charge de divers constituants qui vont lui donner une grande variabilité d'un tissu végétal à un autre et d'une espèce à l'autre. Parmi ces constituants figurent des xylanes (dans les dicotylédones notamment) et en bonne place la lignine, dont la teneur atteint 30 pour cent et plus dans le bois. Voir Hémicelluloses, Lignine, Pectines.

PAS (domaine) - Sigle provenant à l'origine du nom de trois protéines de la Drosophile. Structures caractéristiques, repérées dans de très nombreuses séquences, parfois répétitives, et longues d'une centaine de résidus. Existent chez les animaux, végétaux et bactéries, sont toujours placés dans des protéines cytosoliques ou du côté cytosolique des protéines membranaires. Les domaines PAS accompagnent les protéines formant des associations et intervenant dans la transmission de signaux déclenchés par la lumière, le potentiel redox intracellulaire, le niveau énergétique de la cellule, la présence de l'oxygène, la fixation d'un ligand sur son récepteur... Exemples : Aer dans l'aérotactisme de *E. coli*, NifL, PhoR, ArcB. Les domaines PAS chez les bactéries sont invariablement trouvés dans les régulations à deux composants. Voir l'importante revue par TAYLOR BL & ZHULIN IB (1999) *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* **63** : 479-506.

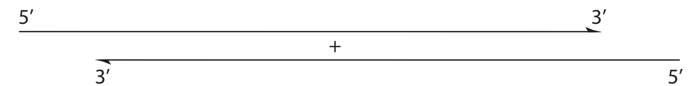
PCE - Désigne couramment le perchloroéthylène ou tétrachloroéthylène.

PCP - Pentachlorophénol.

PCR - *Polymerase chain-reaction*. Technique d'amplification moléculaire portant sur un segment d'ADN disponible en quantité infime. Expliquée sous sa forme simple par un ADN bicaténaire fictif, symbolisé par deux flèches orientées en sens opposé (les biochimistes disent que les deux chaînes dans la double hélice sont antiparallèles). Les fragments d'ADN sont placés dans un mélange contenant les 4 désoxyribonucléotide triphosphates (dTNP), $MgCl_2$, KCl, tampon pH 9, ADN-polymérase Taq (*Thermus aquaticus*) et oligonucléotides synthétiques utilisés comme sondes et amorces.



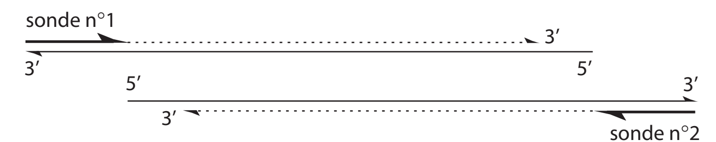
Un chauffage (30 s, 95°C) déroule la double hélice et dénature l'ADN en brins séparés :



On provoque (30 s à 55°C) l'hybridation de chacun des ADN monocaténaires avec une sonde synthétique longue de 10-15 désoxyribonucléotides, la séquence étant ajustée pour être homologue d'une portion de l'ADN dénaturé. Les deux sondes sont en fort excès sur l'ADN à hybrider. La disposition obtenue après hybridation est alors :



Chaque sonde sert d'amorce au travail d'une ADN-polymérase thermostable (à l'origine on a utilisé celle de *Thermus aquaticus*, une bactérie thermophile). Le milieu contient avec les sondes en excès suffisamment des quatre substrats nécessaires et un sel de magnésium. L'enzyme reconstitue (3 min, 72°C) un ADN bicaténaire complet en prolongeant l'extrémité 3' de chaque sonde hybridée, les désoxyribonucléotides étant assemblés selon la séquence complémentaire du brin modèle :

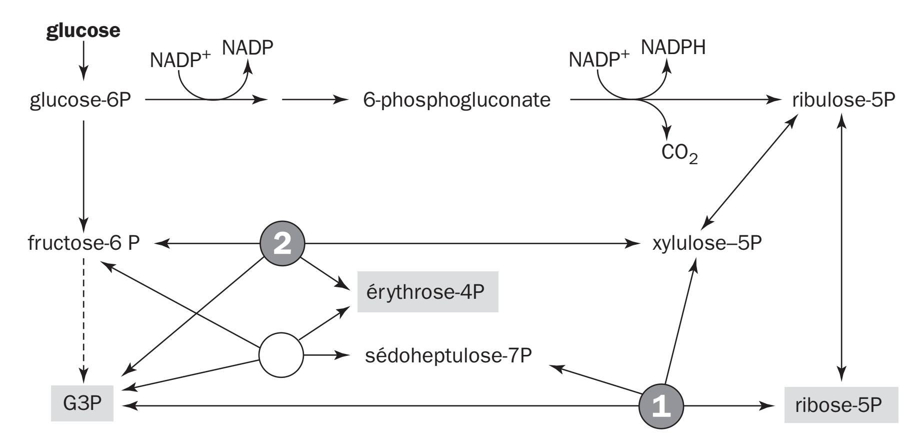


On obtient ainsi deux molécules identiques à la molécule d'ADN de départ. Le cycle est répété, grâce à une petite machine qui programme les étapes successives de chauffage et de refroidissement (iCycler de Bio-Rad). La polymérase en place n'est pas inactivée au cours de la dénaturation de l'ADN et suit toutes les opérations. Si on effectue 35 cycles sur ce principe (en allongeant les étapes à chaque cycle), on obtient à partir d'une molécule d'ADN 2^{35} molécules, soit une énorme amplification du fragment de séquence initial. On trouvera facilement les détails supplémentaires, variantes, difficultés éventuelles et applications dans les manuels de biologie moléculaire. Un rafinement de la technique PCR consiste à introduire des erreurs au cours de l'amplification, conduisant à une banque de gènes contenant individuellement une mutation ponctuelle. Par recombinaison et criblage des mutations, on s'efforce d'obtenir des enzymes "mutantes" dont les propriétés sont améliorées ou modifiées. Lorsque l'ADN de départ est un mélange de fragments obtenus à partir d'une séquence par digestion partielle avec la Dnase I (qui ne coupe pas à des positions spécifiques), ces fragments peuvent être amplifiés sans addition d'amorces, car ils ont des portions de séquence en commun, s'hybrident partiellement et servent mutuellement d'amorce. On obtient alors rapidement une séquence complète et homogène, amplifiée sans le secours des sondes artificielles. La méthode PCR connaît des variantes plus complexes, offre la possibilité d'amplification avec erreurs de séquence, permettant l'obtention de mutations artificielles. Voir aussi *DNA shuffling*.

Pectines - Mélange complexe de polysaccharides colloïdaux qui peuvent être extraits des parois végétales par l'eau et les agents chélateurs comme l'oxalate. Les plus caractéristiques sont les rhamnogalacturonanes I et II, les arabinanes, galactanes, arabinogalactanes I et *D*-galacturonanes. L'arabinose et le galactoses des substances pectiques peuvent être estérifiés par des acides phénoliques tels que l'acide férulique.

Pénicillines - Ces antibiotiques célèbres faisant partie des bêta-lactames sont produits à l'origine par un *Penicillium*. Ils agissent sur les bactéries dont la paroi contient des peptidoglycanes en empêchant la synthèse d'une paroi normale. Les cellules en voie de croissance ont alors une paroi moins rigide qui les rend sensibles à la pression osmotique. Les cellules qui ne croissent pas ne sont pas lésées. Les espèces résistantes ont couramment une pénicillinase (bêta-lactamase).

Pentose-phosphates (Voie des) **-** Voie d'utilisation du glucose dont le point de branchement avec la glycolyse est le glucose-6-phosphate (qui est en même temps le point de départ de la voie d'ENTNER-DOUDOROFF). Les principaux points de sortie sont le 3-phosphoglycéraldéhyde (G3P) vers le pyruvate, l'érythrose-4P précurseur des acides aminés aromatiques, le ribose-5P utilisé dans la synthèse des nucléotides. Enfin l'oxydation du glucose-6P est génératrice de NADPH. Le tableau est le cycle chez la levure de bière. Le cercle blanc symbolise la transaldolase, les cercles noirs les transcétolases 1 et 2.



PEP - Phosphoénolpyruvate.

Peptidoglycanes - Polymères complexes caractéristiques de la paroi des eubactéries, constitués par un maillage de polysaccharides alternés d'acide N-acétylmuramique et de N-acétylglucosamine, liés à des oligopeptides comportant des acides aminés appartenant à la fois aux séries *D* et *L*. Les peptidoglycanes contractent des liaisons covalentes avec des protéines de la membrane externe chez les bactéries Gram-négatives. Appelés aussi muréines.

Périplasme - Dans les bactéries Gram-négatives, désigne l'espace logé entre la membrane interne cytoplasmique et la membrane externe. La première est le siège de transports d'électrons, de la perméabilité sélective et d'activités enzymatiques liées à la conservation de l'énergie ou à des synthèses. Dans le périplasme se trouvent les peptidoglycanes, des protéines de transport, des enzymes déterminées dont la présence est utilisée comme marqueur (phosphatase alcaline ou PhoA, 5'-nucléotidase, β-lactamase, protéines de transport des systèmes ABC, nitrite réductase, certaines déshalogénases…) La plupart de ces protéines sont synthétisées sous forme d'un précurseur porteur d'une séquence additionnelle du côté N-terminal, et celle-ci est éliminée au cours de la sortie dans le périplasme. Le compartiment périplasmique permet à la cellule de disposer des macromolécules fonctionnant au dehors du cytoplasme, sans risquer de les voir s'évader dans le milieu ambiant, et de faire barrière par sa membrane externe à la pénétration d'agents extérieurs, notamment des protéines et des antibiotiques.

Perméase - Dans sa définition ancienne éclairée par l'étude du transport du lactose (A. KEPÈS, J. MONOD), protéine de la membrane interne fixant spécifiquement un substrat extérieur et catalysant son transport actif vers le cytoplasme par couplage avec le potentiel membranaire (éventuellement comme symporteur). Terme souvent étendu aux systèmes catalysant un transport actif à l'aide de plusieurs protéines dont un récepteur périplasmique,

le couplage étant alors généralement effectué par hydrolyse d'ATP (comme les transporteurs ABC). Certains auteurs désignent alors indistinctement par perméase (et peut-être à tort) tout système bactérien de transport.

Peroxydases - Catalysent l'oxydation de substrats variés avec une large spécificité, en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme oxydant. En majorité héminiques. La molécule de peroxyde commence par oxyder le fer et la porphyrine, qui oxydent à leur tour le substrat électron par électron. D'autres peroxydases, dont certaines haloperoxydases, fonctionnent avec du vanadium. Les peroxydases engendrent communément des radicaux, les composés formés donnant lieu à des réactions secondaires de polymérisation conduisant à des produits colorés.

Peroxyde d'hydrogène - H_2O_2. Produit naturel, substrat de la catalase et des peroxydases, fabriqué aussi par l'industrie à raison de plus de 500 000 tonnes par an (en tant que 100%) pour ses multiples applications. Génère facilement des radicaux hydroxyle par catalyse avec Fe(II). Parmi les composés les plus oxydants sont alors dans la hiérarchie :

fluor > radical $OH^{\bullet}$ > ozone > peroxyde d'hydrogène > permanganate > dioxyde de chlore > chlore

Peroxysomes - Particules subcellulaires présentes dans la plupart des cellules eucaryotiques, entourées d'une membrane, souvent en contact étroit avec le réticulum endoplasmique, renfermant la catalase, *D*-aminoacide oxydase, diverses oxydases, des enzymes du catabolisme des acides gras et autres protéines (une cinquantaine dans les peroxysomes de la cellule animale). Les peroxysomes sont considérés comme des reliques de structures où s'effectuaient des oxydations sur O_2 et rendues obsolètes par l'avènement des mitochondries. La multiplication des peroxysomes et la synthèse de leurs protéines sont commandées et régulées par des gènes du noyau. Des peroxysomes spécialisés existent dans le monde végétal, participent à la photorespiration ou effectuent le cycle du glyoxylate (glyoxysomes), notamment au cours de la germination dans le métabolisme des triglycérides.

Pesticide - Composé utilisé pour lutter contre des végétaux ou des animaux jugés nuisibles directement ou indirectement à l'activité humaine. Ils sont désignés selon les cas comme insecticides, acaricides, nématicides, fongicides, rodenticides ou herbicides.

Pétrole brut - On y distingue trois familles chimiques de base :

- Les paraffines. Les hydrocarbures les plus courants de la série dominante sont des alcanes à chaîne droite, C_nH_{2n+2}, Liquides à température ordinaire mais bouillant entre 40 et 200°C, équivalent aux composants principaux de l'essence.
- Les naphtènes (C_nH_{2n}) correspondent à une série cyclique saturée, abondants dans les fractions lourdes.
- Les aromatiques, le plus commun étant le benzène. Les aromatiques ne sont présents qu'en pourcentage restreint dans la majorité des pétroles bruts. À cela s'ajoutent des matières organiques qui sont des restes biologiques fossiles (kérogènes). Le pétrole contient en outre des éléments minéraux, du soufre (de 0,05 à 2% en poids), de l'oxygène et de l'azote. On trouve également des métaux, en particulier du vanadium et du nickel. Dans la hiérarchie des fractions séparées par leur point d'ébullition : les éthers de pétrole, essence, kérosène, gazole, huiles de graissage, huiles lourdes résiduelles, bitume, paraffine. La composition des pétroles bruts varie énormément en fonction du lieu d'extraction. Les pétroles les plus denses sont généralement ceux qui ont le plus de soufre. Dans le commerce international, le pétrole est mesuré en barils contenant chacun 42 gallons US. Une tonne de brut (système métrique) correspond environ à 7,2 barils US.

Phénatole - Ethoxybenzène.

Phénoxyacétates - Famille d'herbicides comprenant notamment le 2,4-D et le 2,4,5-T

Phéromone - Substance sécrétée à l'extérieur d'un organisme et reçue par un autre individu de la même espèce, où elle déclenche une action spécifique, par exemple un comportement ou un développement particulier (KARLSON P & LÜSCHER M (1959) *Nature* **183** : 55-56).

PhoR - Protéine régulatrice caractérisée chez *E. coli*, insérée dans la membrane, contrôlant le régulon Pho et fonctionnant comme détecteur de phosphate. Quand celui-ci est abondant, elle réprime l'expression des gènes de transport *pst* si ces derniers sont fonctionnels.

En phosphate rare, elle agit comme kinase sur la protéine PhoB, formant avec elle un système régulateur classique à deux composants. PhoB phosphorylée agit à son tour comme activateur de transcription pour un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme du phosphate. PhoR en phosphate abondant active PhoU qui déphosphoryle PhoB. Un autre système commandé par CreC/CreB commande également l'activation de PhoB. L'une des protéines réglées par PhoR est la phosphatase alcaline (PhoA), présente chez *E. coli* ; elle se trouve dans le périplasme. Le régulon Pho de *E. coli* contrôle 31 gènes répartis dans au moins 5 opérons.

Phosphate minéral - Généralement limitant pour la croissance de la microflore et des végétaux dans les sols et milieux aquatiques. Le déversement de phosphates par l'activité humaine facilite l'eutrophisation des lacs et cours d'eau. Les phosphates sont peu mobiles dans les sols, car les formes insolubles peuvent représenter 95-99% du phosphore total. La mobilité est augmentée en milieu alcalin. Une source tellurique de phosphate est la fluoro-apatite (3 $Ca_3(PO_4)_2$,CaF_2). Le calcium tend à se fixer à la surface des oxydes de fer et d'aluminium, facilitant la libération du phosphate. Les micro-organismes contribuent à solubiliser le phosphate par des acides (lactique, citrique, oxalique, glycolique) et leur activité est essentielle au niveau de la rhizosphère. En outre ils recyclent les phosphates organiques contenus dans les végétaux morts. Les plantes avides de phosphate (en particulier des végétaux cultivés, luzerne, laitue, pomme de terre...) bénéficient de l'activité microbienne et fongique autour de leurs racines, récupèrent le phosphore contenu dans les cellules mortes et l'assimilent sous forme d'orthophosphate ($H_2PO_4^-$). Les acides humiques et fulviques du sol facilitent aussi la libération de l'orthophosphate en piégeant le calcium, le fer et l'aluminium (GREENLAND DJ & HAYES MHB (1981) *in "Chemistry of Soil Processes"*, John Wiley & Sons, Chichester : 1-21).

Phospholipides - Lipides contenant au moins un groupe phosphate substitué et deux acides gras liés par liaison ester à un polyol tel que le glycérol. Certains phospholipides peuvent renfermer des liaisons éthers ou amidiques, et contenir un alcool de structure complexe. Les phospholipides sont des constituants lipidiques majeurs des membranes biologiques.

Phosphotransférase (Transport) **-** Système de transport actif des sucres tirant son énergie du PEP et étudié notamment chez les entérobactéries. Il comporte trois parties :

- une protéine cytoplasmique ou enzyme I qui s'autophosphoryle avec le PEP comme donneur ;
- la protéine HPr, qui est phosphorylée par l'enzyme I, laquelle s'autophosphoryle avec le PEP comme donneur ;
- une enzyme II spécifique d'un sucre (il y en a une pour le glucose, une pour le mannitol, plus d'une dizaine en tout) qui est le véritable transporteur.

L'enzyme II est phosphorylée par l'intermédiaire d'une protéine III dans le cas du glucose, directement dans le cas du transporteur du mannitol. L'enzyme II fait passer le substrat vers l'intérieur de la cellule en le phosphorylant. Dans le cas du glucose, il apparaît ainsi du glucose-6P qui est directement métabolisable. Quand il n'y a pas de glucose à transporter, la protéine III est phosphorylée au maximum et elle active l'adényl cyclase, l'enzyme génératrice de l'AMP cyclique. Quand la protéine III est faiblement phosphorylée parce que l'enzyme II fait rentrer activement du glucose et tire à elle tout le courant de phosphate, la synthèse d'AMP cyclique est ralentie et en même temps il y activation de certaines perméases, comme celle du lactose. Voir aussi HPr, Répression catabolique.

Photo-autotrophe, photo-hétérotrophe - Voir Phototrophe.

Photorespiration - Consommation d'O_2 liée à la Rubisco. Voir Rubisco.

Photosynthèse - Mécanisme physiologique permettant l'utilisation de l'énergie lumineuse pour la synthèse de molécules organiques à partir de CO_2 (cas général) ou de molécules simples comme source de carbone.

Phototrophe - Organisme utilisant la lumière comme source d'énergie pour sa croissance. Cette utilisation est selon les espèces obligatoire, ou facultative s'il existe une autre source d'énergie en l'absence de lumière. Un photo-autotrophe utilise le CO_2 comme seule source de carbone. Un photo-hétérotrophe utilise simultanément ou exclusivement une autre source

de carbone que le CO_2. Certaines bactéries, comme les pourpres non sulfureuses, peuvent passer alternativement du mode photo-autotrophe au mode photo-hétérotrophe en fonction des conditions du milieu.

Phréatique - Voir Nappe phréatique.

Phycobilines - Pigments tétrapyrroliques des cyanobactéries, attachés par liens covalents aux phycobiliprotéines, faisant partie des pigments antennaires (collecteurs de l'énergie lumineuse) autour du PS2 des cyanobactéries. Leur répartition dans les phycobilisomes permet une adaptation spectrale à la lumière.

Protéine	*Phycobilines*	*Maximum d'absorption (nm)*	*Maximum d'émission de fluorescence (nm)*
Allophycocyanine B	Phycocyanobiline	670	680
Allophycocyanine	Phycocyanobiline	650	660
Phycocyanine C	Phycocyanobiline	620	648
Phycocyanine R	Phycocyanobiline et Phycoérythrobiline	617	642
Phycoérythrocyanine	Phycocyanobiline et Cryptovioline	568	625
Phycoérythrine C	Phycoérythrobiline	565	576
Phycoérythrines B et R	Phycourobiline et Phycocyanobiline	546, 565	576

Phycobilisomes - Complexes antennaires spéciaux associés au PS2 des cyanobactéries et des rhodophytes (algues rouges), renfermant des phycobilines liées à des protéines de plusieurs sortes, selon un plan d'organisation caractéristique. Les phycobilisomes varient en extension et en composition en fonction de la lumière incidente et de sa couleur (adaptation chromatique). Le spectre d'absorption des phycobilisomes complète *grosso modo* celui de la chlorophylle a.

Phylloquinone - Voir Ménaquinones.

Phytate - Myo-inositol hexaphosphate (IP6) appelé aussi acide phytique. Anti-oxydant et réserve de phosphore chez les plantes, notamment les céréales. Peu digéré par le bétail. Les sels de magnésium et de calcium s'appellent phytine.

Phytochélatines (PC) **-** Polypeptides végétaux formés par condensation multiple à partir du glutathion, de structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, où $n > 1$. Ces constituants font partie des métallothionéines de classe III, présentes dans les plantes, les algues et les levures, absentes chez les animaux. Faits par la PC-synthase, une dipeptidyl transférase (EC 2.3.2.15). Celle-ci est activée par un métal. Les complexes PC-métal gagnent les vacuoles servant de lieu de stockage.

Phytochrome - Pigment végétal quasi universel proche de la phycocyanine C des cyanobactéries, permet le réglage de certaines fonctions physiologiques avec la lumière, existe sous 2 formes. L'une, la plus stable, absorbe surtout à 660 nm (lumière rouge), et est induite par le rouge, l'autre à 730 nm, moins stable, et prédomine dans le rouge lointain. Les phytochromes règlent la floraison et la germination, interviennent dans la photopériode. Par exemple la germination des graines de laitue est stimulée en lumière rouge, inhibée par le rouge lointain.

Phytoplancton - Plancton pratiquant la photosynthèse, comprenant des cyanobactéries, et des algues eucaryotiques unicellulaires.

Phytoremédiation - Emploi des plantes pour décontaminer les sols et eaux souterraines.

Photosystème (PS) - Ensemble formé par un centre réactionnel (CR) et un ensemble de complexes antennaires collectant l'énergie lumineuse. Le centre réactionnel fait la

conversion de cette énergie en potentiel chimique. On désigne parfois un photosystème comme le centre réactionnel lui-même, par la lettre P suivi d'un nombre : P700, P870…

Picoplancton - Ensemble des organismes planctoniques dont les dimensions vont de 0,2 à 2 µm seulement.

Piéricidine A - Antibiotique analogue de l'ubiquinone (modifiée sur chaîne latérale).

Pili (ou **pilus** au singulier) **-** Filaments protéiques plus ou moins rigides, émis à la surface des bactéries, intervenant dans leur adhésion à un support (adhésines) ou dans la conjugaison entre cellules (pili de type F). Servent parfois de récepteurs à des virus. Les pili de type IV sont trouvés sur de nombreuses espèces bactériennes, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Neisseria*, *Myxococcus*. Leur longueur est de l'ordre de 4 µm, sur un diamètre de 6 nm. Constitués de sous-unités majoritaires de piline, selon un arrangement hélicoïdal de 5 sous-unités par tour.

pK_a - Si K_a est la constante de dissociation d'un acide AH, c'est-à-dire la constante de l'équilibre $AH \leftrightarrow A^- + H^+$ (le proton étant accepté par une molécule d'eau en solution aqueuse), $pK_a = -\log K_a$. L'équilibre étant déplacé en fonction du pH, celui-ci règle l'ionisation des groupes dissociables. Pour les groupes acides (donneurs de protons) tels que la fonction carboxylique, l'équilibre $R–COOH \leftrightarrow R–COO^- + H^+$ correspond à un pK_a allant le plus souvent de 3 à 6, et ces fonctions sont généralement ionisées à pH neutre. Pour une amine aliphatique primaire $R\text{-}NH_2$, l'équilibre $R\text{-}NH_3^+ \leftrightarrow R\text{-}NH_2 + H^+$ a un pK_a supérieur à 8, et ces fonctions sont le plus souvent cationiques à pH neutre.

Planctomyces - Bactéries bourgeonnantes, formant des colonies enrobées de glycocalyx à la surface des algues, des cyanobactéries et des plantes dans les eaux douces et marines. Caractérisées par l'absence d'une paroi de peptidiglycane, mais une couche protéique (couche S). Le cycle comporte une phase mobile flagellée et une phase fixée. Vivent par hétérotrophie, aérobies facultatives, habitats très divers, des milieux très pauvres aux eaux fortement polluées.

Plasmide - Molécule d'ADN bicaténaire, le plus souvent circulaire, capable de se répliquer dans la cellule indépendamment du génome principal. Il existe aussi des plasmides linéaires non refermés sur eux-mêmes. La taille des plasmides varie de quelques milliers de pdb à plus de 100 000 (mégaplasmides). Peut être transmis de cellule à cellule par conjugaison et s'insérer éventuellement dans le chromosome bactérien. Le nombre d'exemplaires du plasmide par cellule est variable et régulé. Les plasmides ne transportent pas des gènes indispensables à la croissance et à la reproduction cellulaire, mais souvent des gènes porteurs de potentialités nouvelles, comme la résistance à des antibiotiques ou à des métaux, la dégradation de substrats "exotiques" ne faisant pas partie du menu habituel de l'espèce, la virulence (chez les pathogènes)… Une revue exhaustive de la réplication et du contrôle des plasmides circulaires bactériens a été publiée par DEL SOLAR G et coll. (1998) *Microbiol. Molec. Biology Rev.* **62** : 434-464.

Plastique (matière) **-** Une matière plastique a pour propriété physique de se déformer uniquement pour des contraintes mécaniques supérieures à une valeur seuil. Ce sont toujours des polymères. Dans la pratique on réserve le terme de "plastique" aux matériaux synthétisés par l'homme à partir de monomères naturels ou artificiels. Voir Elastomère.

Plastocyanine - Petite protéine contenant du cuivre, fonctionnant comme transporteur d'électrons dans la photosynthèse des chloroplastes et cyanobactéries, faisant partie comme l'azurine de la famille des cuproprotéines transporteurs d'électrons. Voir Azurine.

Plastoquinone - Quinone lipophile membranaire de structure similaire à celle des ubiquinones, mais avec remplacement des groupes méthoxyles par des méthyles. Même fonction, mais dans la photosynthèse oxygénique des chloroplastes et cyanobactéries.

PMS - Phénazine méthosulfate. Colorant jaune réduit en $PMSH_2$ par de nombreuses enzymes. $PMSH_2$ se réoxyde rapidement à l'air, ou réduit encore plus rapidement le DCIP, avec lequel il est souvent utilisé dans les tests. Inversement, lorqu'une déshydrogénase inactive sur O_2 réduit le PMS, on peut transformer commodément l'enzyme en oxydase puisqu'on obtient alors la chaîne d'oxydoréductions substrat $\rightarrow \rightarrow$ PMS $\rightarrow O_2$. La solution de

PMS doit être préparée immédiatement avant l'expérience. Elle est sensible à la lumière, peu stable et devient inactive (avec une couleur verte intense).

Polaire (mutation) - Mutation ayant pour effet de bloquer l'expression de l'information en aval, en provoquant un arrêt de la transcription ou en introduisant sur son parcours un codon Stop.

Polaire (substance) - Une entité chimique est dite polaire lorqu'elle porte une charge ionique et contient des liaisons polaires établies entre atomes d'électronégativité différente, comme C et O, O et H, et possédant un moment dipolaire. Les substances polaires tendent à être solubles dans l'eau car les molécules d'eau sont elles-mêmes polaires (attractions dipole-dipole), et la solubilité peut être renforcée par l'établissement de ponts hydrogène entre le soluté et le solvant. Une forte solubilité d'un composé polaire dans l'eau n'est pas un caractère automatique, quand les molécules de soluté tendent à s'associer entre elles de telle manière que l'énergie mise en jeu est plus forte que l'énergie de solvatation du soluté par le solvant. Exemples de produits polaires peu solubles : la tyrosine (à pH neutre), la cellulose.

Polymérisation radicalaire - Caractéristique des polymérisations de type vinylique (styrène, acrylamide, chlorure de vinyle…). Présente les 3 phases habituelles : amorçage, élongation, terminaison. L'amorçage est la transformation du monomère A en A°. L'élongation démarre par addition du radical sur une molécule non radicalaire pour donner un dimère, qui devient lui-même un radical A–A°. Celui-ci réagit à nouveau avec un monomère pour donner A–A–A° et ainsi de suite. La réaction d'arrêt fait réagir une chaîne en cours de croissance A–A–…–A° avec un autre radical A°, R°, oxygène), qui le neutralise : A–A–…–A° + A° → A–A–…–A–A.

Polysulfure réductase - EC 1.8.99.- Chez *Wollinella succinogenes*, utilise comme accepteur final le polysulfure formé chimiquement à partir du soufre élémentaire et du sulfure.

Pompe à protons - Système membranaire, souvent une ATPase ou un cytochrome, qui transmet les protons dans une direction préférentielle à travers la membrane. Le résultat est un couplage énergétique, transformant l'énergie ATP ou celle d'une oxydation en force proton-motrice. Certaines ATPases sont des pompes contribuant à l'acidification des vacuoles et lysosomes.

Porines - Protéines ménageant un canal traversant la membrane externe des bactéries Gram-négatives, facilitant le passage, souvent faiblement sélectif, d'entités hydrophiles : ions, molécules de petite taille ou même polypeptides. Etudiées en détail chez les entéro-bactéries. OmpF et OmpC sont des protéines abondantes (2% des protéines cellulaires), participant au contrôle de la pression osmotique cellulaire. Leur synthèse est régulée par le système à deux composants EnvZ/OmpR. Le rapport OmpF/OmpC est élevé en pression osmotique faible, bas dans le cas contraire. Ces porines ont une structure cylindrique spéciale traversant la membrane externe par 16 barreaux bêta antiparallèles, ménageant une ouverture centrale dont le diamètre est légèrement supérieur à 1 nm. La séquence du gène montre habituellement un segment supplémentaire codant pour un peptide signal (voir Signal).

Porphyrine - Vaste famille de pigments et cofacteurs qui présentent à l'état libre et en lumière ultraviolette une vive fluorescence rouge. Dérivés tétrapyrroliques cycliques, dont les formules peuvent être ramenées à celle de la porphine. Sont synthétisées à l'intérieur des cellules, la principale voie partant du succinate et de la glycine, se diversifiant dans plusieurs directions : porphyrines héminiques, sirohème, chlorophylle, corrinoïdes, F430. L'activité biologique des porphyrines fait généralement appel à l'association avec un ion métallique. Les complexes formés avec Fe, Cu, Ni et Co ne fluorescent pas, contrairement à ceux de Zn, Mg et Cd. Le tableau ci-contre rassemble quelques exemples importants.

Potentiel redox (Potentiel d'oxydoréduction) - donné en millivolts (mV) par la relation E' = E'° + k log [Ox]/[Red] (pH 7), 25°C, conditions normales, où k vaut à peu près 59 pour un seul électron transféré, la moitié pour 2 électrons transférés. E'° est le potentiel standard obtenu quand il y a autant de forme oxydée [Ox] que de forme réduite [Red]. Quand la transformation est mole pour mole, E'° est en même temps le potentiel de demi-réduction ou E'_m.

Ion	Porphyrine	Protéines et fonctions
Fe	Hème B	Hémoglobines, myoglobines, cytochromes, peroxydases héminiques, catalases, P450, chloroperoxydase Le noyau de base commun est la protoporphyrine IX
Fe	Hème C	Cytochrome bo, quinol oxydase, cytochrome c_{554} (oxydation de l'ammoniac), cytochromes c de la photosynthèse
Fe	Hème A	Cytochrome c oxydases des chaînes respiratoires
Fe	Hème O	Cytochrome bo, quinol oxydase bactérienne
Fe	Hème D	Cytochrome cd, nitrite réductase
Fe	Sirohème	Nitrite et sulfite réductases
Fe	P460	Hydroxylamine oxydoréductase
Mg	Chlorophylles	Photosystèmes, pigments antennaires de la photosynthèse
Co	Corrinoïdes	Cobamides, cobalamines, vitamine B12, établissement et transferts de liaisons entre éléments mono-carbonés, méthanisation
Ni	F430	Facteur de la méthanisation

Pourriture blanche - Terme désignant les champignons basidiomycètes filamenteux qui ont la propriété de détruire à la fois les polysaccharides et la lignine du bois (décoloration) à l'aide d'enzymes extracellulaires qui sont des oxydases génératrices de peroxyde et des peroxydases (LiP et MnP). Espèce la plus étudiée : *Phanerochaete chrysosporium*.

ppm - partie par million (en unités de masse).

ppmv - partie par million en volume.

PQQ - Pyrroloquinoline quinone. Cofacteur de déshydrogénases extracellulaires ou membranaires actives sur méthanol, divers alcools et sucres. Synthétisé à partir de glutamate et de tyrosine, approprié à des mécanismes radicalaires. Produit rouge vif très stable, échangeable entre micro-organismes dans le sol où sa présence interviendrait dans l'équilibre entre diverses espèces bactériennes. Voir GOODWIN PM & ANTHONY C (1998) *Adv. Microb. Physiol.* **40** : 1-80.

Promoteur - Portion d'ADN reconnue par un facteur sigma, autorisant l'attachement de l'ARN-polymérase et le démarrage de la transcription en ARN (parfois avec l'aide de facteurs supplémentaires). Il n'y a pas de séquence unique de promoteur, mais un consensus où certaines bases et leur espacement jouent un rôle critique. Les promoteurs appartiennent à plusieurs familles adaptées à la reconnaissance par un facteur sigma déterminé. Les promoteurs les plus courants chez les bactéries sont reconnus par le sigma-70. Ils sont caractérisés par deux "boîtes" centrées sur les positions – 10 et – 35, placées en amont du départ de la transcription, et non transcrites en ARN. La première facilite l'ouverture de la double hélice d'ADN, prélude à l'amorçage. La seconde est plus orientée vers la reconnaissance du promoteur. La séquence d'un promoteur est toujours représentée sur le brin d'ADN dit "signifiant", sur lequel sera également indiqué la séquence des gènes placés en aval. Le promoteur détermine donc dans quel sens l'ARN-polymérase va parcourir l'ADN servant de modèle.

Prophage - Génome d'un bactériophage intégré au chromosome d'une bactérie hôte dite lysogène. Voir Lysogénie.

Prosthèque - Prolongement cellulaire plus ou moins effilé, comportant du cytoplasme en quantité réduite, la membrane plasmique et la paroi. Les bactéries à prosthèque sont généralement fixées à un support solide par leur base et ont une division asymétrique. Une nouvelle cellule se forme par bourgeonnement à l'extrémité de la prosthèque. Elle est flagellée, et après division nage vers un nouveau support sur lequel elle se différenciera à nouveau. Ce mode de propagation est bien représenté par les *Caulobacter*, qui adhèrent à des plantes, d'autres bactéries ou des particules du sol. Elles se développent en général

dans des milieux très pauvres, et l'allongement de leur prosthèque en fin filament leur permet d'augmenter la surface de leur membrane et de mieux capter les éléments dissous. Les *Hyphomicrobium* appartiennent aussi à cette catégorie. Les cellules fixées peuvent bourgeonner à répétition des cellules migratrices flagellées. Les *Hyphomicrobium* sont des méthylotrophes facultatifs. Ils peuvent se développer sur des milieux extrêmement pauvres en source carbonée, et probablement en captant des traces de composés apportés par l'atmosphère. Ces bactéries se développent facilement dans un bain marie de laboratoire.

Protéase - Catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans les protéines. La plupart des protéases ont une sélectivité plus ou moins accentuée, attaquant préférentiellement les liaisons peptidiques localisées dans un environnement moléculaire défini, soit par la séquence des acides aminés au niveau de la coupure, soit par l'organisation spatiale de la cible. La plupart des protéases ont en même temps une activité comme estérase. Il y a quatre grandes classes de protéases en fonction du nucléophile de leur site réactionnel :

- protéases à sérine (dont fait partie la trypsine) ;
- protéases à cystéine (comme la papaïne) ;
- protéases à aspartate (comme la pepsine) ;
- métalloprotéases (du type thermolysine).

Protéases à cystéine - Voir Protéase.

Protéases à sérine - Les archétypes sont la trypsine et la chymotrypsine. La sérine du site actif acquiert un pouvoir nucléophile fort dans un environnement spécial, et se comporte comme un alcoolate. Elle attaque le carbonyle de la liaison à rompre, qui est un lien peptidique ou amidique (CO–NH), ou ester (CO–O–R). Établit un lien, covalent temporaire qui est scindé par hydrolyse dans une deuxième phase. Il y a un nombre immense de ces enzymes dans la nature, où elles ont des fonctions très diverses. Elles sont caractérisées par la "triade" de trois résidus essentiels, His, Asp et Ser disposés dans cet ordre dans la vaste sous-famille de protéases homologues où se trouve la trypsine. Dans une autre sous-famille, l'ordre dans la séquence est différent (Asp, His, Ser) et résulte d'une évolution indépendante et convergente. On y trouve par exemple des protéases des bactéries Gram-positives, dont la subtilisine est l'exemple le plus connu.

Protéine A - Récepteur très stable porté à la surface de *Staphylococcus aureus*, liant efficacement les immunoglobulines, notamment les IgGs (sur leur partie Fc). Outil de recherche classique pour des marquages par fluorescence, tests ELISA, chromatographies d'affinité.

Protéine kinase - Enzyme catalysant la phosphorylation par l'ATP à des sites spécifiques d'une ou plusieurs protéines, qui sont activées ou inhibées selon les cas. Les cascades régulatrices par protéine kinases sont particulièrement développées chez les eucaryotes, phosphorylent en général sur sérine dans les régulations du métabolisme, sur histidine dans le contrôle de la division cellulaire et de la différenciation. Des protéines phosphatases renversent l'action des kinases.

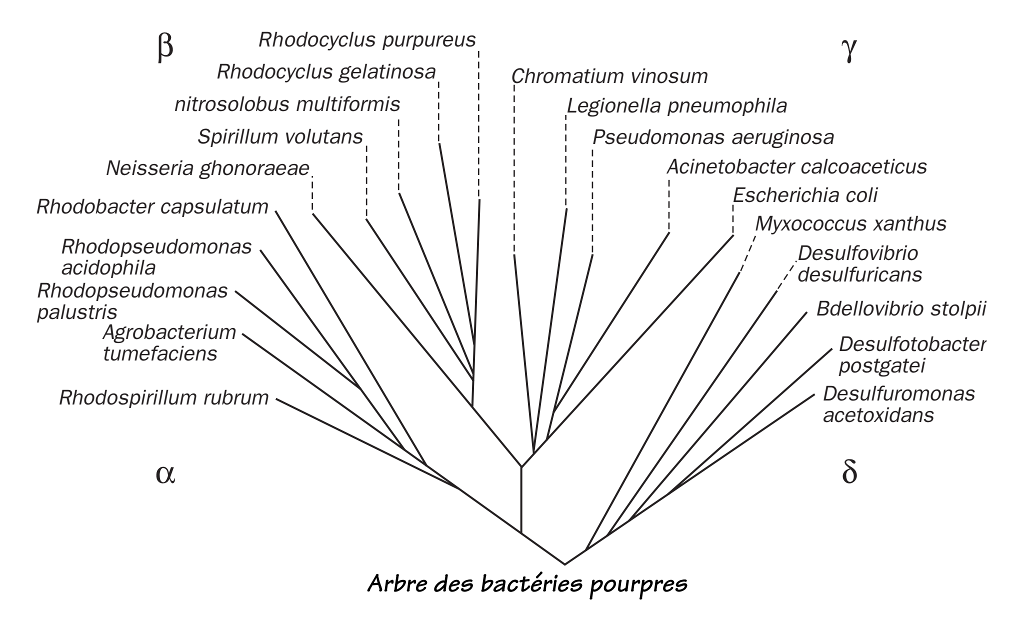
Protéobactéries - Font partie des eubactéries. Appelées aussi bactéries pourpres, ensemble très important rassemblant les bactéries pourpres photosynthétiques et les formes apparentées non photosynthétiques, et contenant la majorité des bactéries dites Gram-négatives. On les distingue en sous-groupes α, β, γ et δ dans un arbre généalogique (ci-contre) calculé sur la base de l'ARN 16 S (WOESE C (1987) *Microbiol. Rev.* **51** : 221-271).

Protéome - Ensemble des protéines codées par le génome d'une cellule.

Protiste - Eucaryote vivant sous forme de cellules isolées ou groupées dans des colonies simples. Les protistes représentent un groupe hétérogène dérivant des premiers eucaryotes. On peut distinguer sommairement les protozoaires proches des animaux, les algues unicellulaires, proches des végétaux, et les fongiformes proches des mycètes.

Protocatéchuique (Acide) **-** Acide 3,4-dihydroxybenzoïque.

Protonmotrice (Force) **-** Notée Δp, exprimée en volts ou millivolts. Equivalent d'une force électromotrice, les électrons étant remplacés par des protons. La force protomotrice au niveau d'une biomembrane est le potentiel qui favorise le passage des protons d'un côté à l'autre.



Arbre des bactéries pourpres

Protonophore - Composé rendant une membrane biologique perméable aux protons.

Protoporphyrine IX - Porphyrine qui devient l'hème B après adjonction du fer, présente dans l'hémoglobine, les cytochromes b et P450, la catalase et les peroxydases.

Pseudo-azurine - Transporteur d'électrons (*Alcaligenes faecalis*) de structure voisine de celle de l'azurine, mais de séquence assez différente. Donneur de la nitrite réductase.

Pseudomonas - Bactéries Gram-négatives (gamma-protéobactéries) en forme de bâtonnet, à un ou plusieurs flagelles à une extrémité. Essentiellement aérobies, en principe ne font pas de fermentations mais la dénitrification est répandue dans le genre. Certaines espèces ont une sorte de fermentation par catabolisme de l'arginine, beaucoup font du poly-hydroxy-butyrate. La taxonomie des *Pseudomonas* a été revue à la faveur des analyses d'ARN 16S. Un groupe entier comprenant des *Pseudomonas* pathogènes pour les animaux et les plantes a été rebaptisé *Burkholderia*. Les *Pseudomonas* sont remarquables par l'immense diversité de leur habitat et les très nombreuses oxydations et biodégradations que réalisent certaines espèces. Les *Pseudomonas* fluorescents comme *P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida, P. syringae*, ne font pas de poly-hydroxybutyrate, mais laissent diffuser un pigment fluorescent.

Psychrophile - Espèce croissant de 0 à 20°C, avec optimum au-dessous de 15°C. Les psychrophiles extrêmes se développent au-dessous de 5°C ou sur la neige (algues, lichens) et dans l'eau en surfusion, la vedette revenant aux organismes observés dans le lac Vostok à 3600 m sous la surface de la calotte glaciaire de l'Antarctique, laissant supposer la possibilité d'une forme de vie existant sous l'océan gelé de la surface d'Europa, un satellite de Jupiter.

Psychrotrophe - Espèce croissant de 0 à 30-35°C.

Putidarédoxine - Ferrédoxine à noyau fer-soufre de type [2Fe-2S] lié à 4 résidus de cystéine, commune dans les oxygénases bactériennes. Elle intervient notamment dans l'oxygénation du camphre et représente une famille de ferrédoxines procaryotiques souvent plus ou moins interchangeables expérimentalement, dans laquelle on trouve aussi l'adrénodoxine des mitochondries des glandes surrénales. Leur séquence renferme un consensus Cys-xxxxx-Cys-xx-Cys-x(n)-Cys.

Pyridoxal phosphate - Coenzyme dérivé de la vitamine B6, intervenant dans de nombreuses conversions métaboliques des acides aminés, nécessaire au fonctionnement des

aminotransférases, des racémases et décarboxylases des acides aminés, de la *L*-sérine-hydroxyméthyl transférase, de la *L*-tryptophane synthase, de la tryptophanase…

Pyruvate décarboxylase - Dans la fermentation alcoolique de la levure, transforme l'acide pyruvique (CH_3-CO-COOH) en acétaldéhyde (CH_3-CHO) et CO_2. Le cofacteur caractéristique est le TPP. Le plus souvent la pyruvate décarboxylase est intégrée dans un complexe multi-enzymatique où l'aldéhyde est oxydé et transféré sur coenzyme A ou du phosphate pour donner de l'acétyl-CoA ou de l'acétyl-phosphate.

Pyruvate formiate lyase - Catalyse : Pyruvate + CoA $\rightarrow$ Formiate + Acétyl-CoA. L'enzyme (EC 2.3.1.54) ou PFL est bien connue dans la fermentation acide mixte de *E. coli*, et le formiate est une source d'électrons pour la dénitrification. Son site actif a deux thiols adjacents. Mais sa particularité remarquable est d'avoir un fonctionnement radicalaire. Un résidu de glycine est transformé en radical par une protéine d'activation ou PFL activase, contenant un noyau fer-soufre et une flavine réduite comme réducteur. L'activase utilise la S-adénosyl-méthionine comme donneur de radical (WAGNER *et al.* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm* **254** : 306-310). Le radical glycyle transforme en radical l'un des deux thiols essentiels du site actif.

Quinol - Quinone réduite à deux électrons, appelée aussi hydroquinone.

Quinol oxydase - Enzyme respiratoire utilisant O_2 comme accepteur et recevant ses électrons directement à partir d'une quinone réduite (quinol) sans passer par un cytochrome c.

Quinones respiratoires - Transporteurs d'électrons exclusivement membranaires, dérivés de la benzoquinone (ubiquinones) ou naphtoquinone (menaquinones). Oscillent entre l'état oxydé (quinone), l'état réduit (quinol ou hydroquinone) avec un stade intermédiaire radicalaire (semiquinone).Les menaquinones dont le potentiel redox est plus bas que celui des ubiquinones se rencontrent particulièrement dans les chaînes anaérobies. La structure chimique contient greffée sur le noyau une longue chaîne isoprénoïde contenant un nombre variable d'unités en C5 et conférant à la molécule son caractère lipophile marqué.

Racémase - Enzyme de la classe 5 (une isomérase EC 5.x.x.x) qui transforme une molécule optiquement active en son inverse par une réaction réversible.

Raman (spectre) **-** Technique de spectrométrie infrarouge examinant la lumière diffusée perpendiculairement à la radiation incidente. La lumière diffusée est majoritairement à la même fréquence que la radiation incidente (diffusion RALEIGH) et comporte des radiations beaucoup plus faibles comportant des écarts de fréquence par rapport à la précédente (raies RAMAN). Les écarts de fréquence donnent une indication sur les mouvements de vibration des molécules et aident en même temps à les caractériser.

Récepteur - Protéine capable de capter réversiblement des ligands déterminés, sans les transformer. Dans la plupart des cas, la liaison fait naître un signal qui sera perçu par d'autres composants cellulaires. Dans des cas particuliers le ligand est remplacé par la lumière (photorécepteurs). Beaucoup de récepteurs sont membranaires, reconnaissent spécifiquement des ligands extérieurs et préviennent de leur présence la machinerie cellulaire. Le signal engendré apparaît sous forme d'une modification conformationnelle du récepteur (avec dimérisation éventuelle) qui est alors reconnue par d'autres protéines venant à son contact, ou peut faire apparaître une activité enzymatique sur le récepteur lui-même. Dans ce dernier cas le récepteur activé transmet le signal en modifiant d'autres protéines, souvent en agissant comme kinase. Inversement on connaît des enzymes qui fonctionnent comme récepteur dans des situations particulières. Au point de vue des mécanismes moléculaires mis en jeu, il n'y a pas de démarcation rigoureuse entre récepteurs et enzymes.

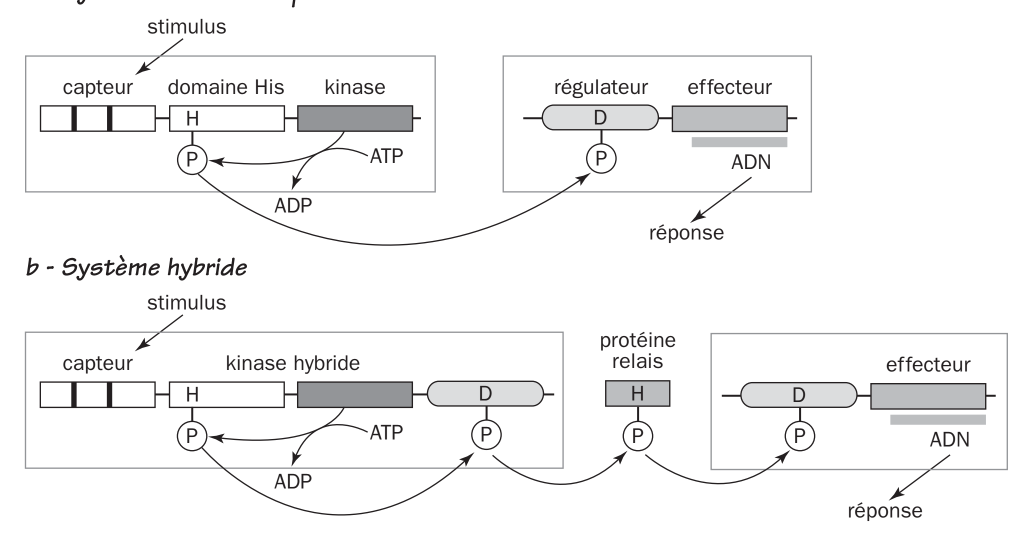
Recombinaison - Mécanisme par lequel un nouvel ADN recombinant est formé à partir de portions provenant de deux ADN parents. Chez les eucaryotes le processus s'accompagne d'un échange entre parties de chromosomes ou crossing over. Il en résulte un changement dans l'agencement des gènes et habituellement une modification du phénotype. La recombinaison homologue met en jeu un échange réciproque entre une paire de séquences homologues, par un mécanisme de cassure et de réunion commandé par des facteurs enzymatiques dont RecA. Une homologie au moins partielle entre les séquences partenaires y joue un rôle essentiel et détermine le lieu où se fera l'échange. La recombinaison non

homologue peut être spécifique de site et s'observe dans l'insertion d'un ADN viral ou autre à un endroit précis du chromosome bactérien. Ce type de recombinaison implique la coupure transitoire des ADN partenaires sur les deux brins, et leur jonction sans faire intervenir d'hydrolyse d'ATP ou de synthèse d'ADN. Le premier cas très classique de ce type est l'insertion du prophage Lambda dans le génome du colibacille. D'autres recombinaisons non homologues ne se font pas en des sites déterminés. La transposition est un cas particulier de recombinaison, dite recombinaison réplicative (Tn3)…

Réductases - Enzymes catalysant la réduction d'un substrat en utilisant un donneur d'électrons qui est souvent NADH ou NADPH. Le substrat est organique à faible masse moléculaire (fumarate, glutathion), macromoléculaire (ferrédoxine, cytochrome P450), oxygénase à fer non héminique, ou encore minéral (Hg^{2+}, nitrate). Les réductases contiennent typiquement une flavine, notamment FAD, ou une déazaflavine comme F420 chez les méthanogènes.

Régulation globale - Voir Modulon, Régulon.

Régulations à deux composants - Systèmes fréquents chez les bactéries (on en dénombre déjà 62 chez le colibacille) où ils peuvent représenter 1% des protéines totales. Dans le cas le plus simple, ils sont constitués de deux protéines, un capteur et un régulateur (activateur de transcription). Le capteur reconnaît un signal physiologique spécifique et agit comme protéine kinase sur lui-même, en se phosphorylant sur un résidu d'histidine (histidine kinase). C'est un dimère fonctionnant par trans-phosphorylation, où chaque sous-unité utilise l'ATP pour phosphoryler sur histidine la sous-unité partenaire. Dans les protéines fonctionnant comme capteur, on note généralement la présence dans leur structure d'un domaine cytoplasmique caractéristique appelé PAS (voir PAS). Le capteur ainsi phosphorylé se décharge de son phosphate sur la deuxième protéine qui est une phosphotransférase dont le domaine N-terminal, très conservé, contient un résidu d'aspartate phosphorylable. La phosphorylation de l'aspartate détermine un changement structural qui renforce en général la liaison de la protéine sur ADN en des sites spécifiques, lui permettant de jouer un rôle comme activateur de la transcription. La chaîne de phosphorylations intermédiaires peut être allongée par des protéines phosphorylables supplémentaires. Ce type de régulations est moins fréquent chez les champignons et les levures, mais existe aussi chez les amibes (*Dictyostelium*) et les plantes (*Arabidopsis*), à commencer par la régulation hormonale fondée sur l'éthylène. On a identifié chez *Arabidopsis* au moins 15 gènes régulateurs de cette catégorie.



Système à deux composants

Chez les eucaryotes en général, la régulation ne se fait pas directement par activation des gènes, mais sur des facteurs situés en amont de cascades régulatrices plus complexes (MAP kinase). Dans les cas les plus simples chez les procaryotes, la transcription des gènes concernés est alors activée (principe *a* sur le schéma). Ces gènes sont groupés éventuellement en plusieurs opérons, et forme ce qu'on appelle un modulon. La cascade des deux composants, capteur et activateur, peut alors mettre en route l'expression de toute une collection de gènes concernés par une grande fonction. Le système est renvoyé à son point de départ après déphosphorylation de l'activateur de transcription par une phosphatase. Un tel mode de régulation, commun chez les bactéries, est donc réversible ; il "allume" ou "éteint" globalement une collection de gènes en fonction d'une action extérieure : oxygène, pression osmotique, présence de certaines substances ou d'ions… (Voir aussi OmpR, FixL/FixJ). Certains systèmes à deux composants sont un peu plus compliqués. Une même protéine dite kinase hybride servant de capteur contient aussi un domaine à histidine phosphorylable, qui phosphoryle à son tour sur histidine une protéine servant de relai supplémentaire dans le mécanisme régulateur (partie *b* du schéma ; voir Hpr). Le modèle *b* se rencontre plus fréquemment chez les eucaryotes. Les domaines régulateurs contenant un aspartate phosphorylable indiqué par D possède en même temps un pouvoir de phosphatase, qui permet la désactivation par enlèvement du groupe phosphate, dans un laps de temps extrêmement variable allant de quelques secondes à plusieurs heures.

Régulon - Ensemble d'opérons bactériens ou de gènes isolés, dispersés dans le génome, placés sous la dépendance d'un même système de contrôle - facteur d'amorçage (sigma) et promoteurs correspondants, protéines régulatrices spécifiques. Un régulon correspond typiquement à une même grande fonction physiologique dont le fonctionnement nécessite l'intervention simultanée de nombreux facteurs : choc thermique, entrée en phase stationnaire, métabolisme azoté, carence nutritive, milieux oxydant, surpopulation… Voir aussi PhoR. Il peut exister un chevauchement partiel entre régulons. Par exemple un gène donné activé au sein d'un régulon sous l'effet d'un signal de stress peut être activé aussi par un autre régulateur sous l'effet d'un stress différent.

Rep (Séquences) - *Repetitive extragenic palindromic sequences*. Plus courtes que les IS (35-40 kb seulement), séquences répétitives abondantes dans certains génomes, réparties irrégulièrement, responsables de structures particulières dans l'ADN. Fonction imparfaitement connue, pourrait intervenir dans les recombinaisons et réarrangements adaptatifs du génome, dans l'attachement de l'ADN à la membrane et la fixation de la gyrase (voir Gyrase).

Réplicon - Portion d'ADN qu'une cellule sait répliquer et transmettre à sa descendance au cours des divisions. Chez les bactéries, le "chromosome" est un grand réplicon. Le génome de la cellule contient un ou plusieurs réplicons qui sont constitués de molécules d'ADN géantes refermées en cercles covalents. Les plasmides sont des réplicons plus petits distincts des chromosomes. Chaque réplicon contient les signaux nécessaires pour que la réplication démarre en un point origine, se propage sur le cercle entier et sépare les deux copies.

Répresseur - Protéine régulatrice capable de se lier à l'ADN en une zone appelée opérateur, ayant pour effet de bloquer la transcription des gènes situés en aval, et donc leur expression. Ce blocage est levé ou renforcé réversiblement selon les cas, par interaction avec des produits étrangers servant de signaux régulateurs. Par exemple l'expression des gènes de l'utilisation du lactose chez le colibacille est entravée par un répresseur. En liant un β-galactoside, le répresseur subit un changement de conformation qui rend le blocage moins efficace. Les gènes d'utilisation du lactose sont alors exprimés, donc induits, et les β-galactosides qui déclenchent cette action sont désignés comme des inducteurs. Le gène *lacZ* de l'enzyme essentielle, la β-galactosidase de *E. coli*, est souvent utilisé dans des tests de biologie moléculaire et recombiné avec d'autres gènes en vue d'étudier leur expression.

Répression - Mécanisme inverse de l'induction, a pour effet d'entraver l'expression de un ou plusieurs gènes, généralement groupés en opérons chez les bactéries.

Répression catabolique - Mécanisme régulateur qui consiste à empêcher une bactérie d'exprimer des gènes codant pour des enzymes de dégradation, quand le milieu renferme une source carbonée plus favorable ou plus directement assimilable par l'arsenal enzymatique banal de la cellule. La répression catabolique s'oppose à l'induction. Le glucose est souvent une telle source, qui est attaquée en priorité. Aussi longtemps qu'elle n'est pas épuisée, l'induction des enzymes de dégradation de la seconde source est inhibée. D'où le nom de répression catabolique, primitivement appelée "effet glucose", mais qui n'est pas actionné exclusivement par le glucose. Ce phénomène est responsable de la diauxie, ou croissance en deux temps, qu'on observe éventuellement (mais pas obligatoirement) dans une culture utilisant deux sources carbonées. La répression catabolique de l'opéron du lactose s'explique par une chute d'AMP cyclique, dont la protéine CAP (ou CRP) a besoin pour activer la transcription. La montée de l'AMP cyclique dans la cellule est un signal correspondant *grosso modo* à un besoin de mobiliser les ressources énergétiques. Quand le glucose est abondant, la chute de l'AMP cyclique déclenche la répression catabolique de façon à ce que le glucose soit utilisé en priorité, et ce phénomène est dû à l'intervention du transporteur de glucose dans le cas de la phosphotransférase (voir cette rubrique). La répression catabolique chez *E. coli* n'est pas déclenchée par d'autres substrats de croissance comme le glycérol. De façon générale, ce type de contrôle est très fréquent dans les biodégradations de substrats naturels ou artificiels, notamment dans l'attaque des xénobiotiques, qui est entravée par la présence dans le milieu d'un substrat de croissance plus favorable.

Résidu - Terme utilisé dans le jargon scientifique avec son sens anglo-saxon, pour désigner ce qui reste d'un acide aminé lorsqu'il est logé dans un polypeptide, après départ d'une molécule d'eau pour chaque liaison peptidique formée. Les abréviations standards sont :

A	Alanine	G	Glycine	M	Méthionine	S	Sérine
C	Cystéine	H	Histidine	N	Asparagine	T	Thréonine
D	Aspartate	I	Isoleucine	P	Proline	V	Valine
E	Glutamate	K	Lysine	Q	Glutamine	W	Tryptophane
F	Phénylalanine	L	Leucine	R	Arginine	Y	Tyrosine

Résistance mutiple (*multidrug resistance* MDR) **-** Complexe périphérique permettant aux bactéries d'expulser des substances toxiques, notamment des antibiotiques, couplé avec l'énergie du potentiel de membrane. Le colibacille a au moins une dizaine de MDR, lui permettant de se défendre contre une gamme très étendue d'antibiotiques, une situation détéctée chez de nombreuses espèces. Chez les Gram-positifs, diverses pompes actionnées par le potentiel membranaire repoussent des cations hydrophobes, tels que le bromure d'éthidium ou l'acriflavine. Parmi les MDR du colibacille, les plus étudiés sont EmrAB et AcrAB, possédant une protéine membranaire (A) et une protéine de jonction avec la membrane externe (B).

Résolvase - Enzyme codée par transposon, venant seconder l'action de la transposase quand le déplacement se fait avec réplication. Après celle-ci, les deux exemplaires de celui-ci restent attachés dans un "co-intégrat". La résolvase permet de démêler cette association, permettant à l'un des exemplaires de rester sur place et à l'autre de s'installer ailleurs.

Résorcinol - 1,3-dihydroxybenzène.

Respiration - Chaîne d'oxydations implantées au moins partiellement dans une membrane biologique, où l'énergie des transferts d'électrons est couplée à l'établissement d'un potentiel électrochimique ou potentiel de membrane, ordinairement par translocation unidirectionnelle de protons ou d'ions sodium. Les différentes respirations sont caractérisées par leur accepteur terminal, qui est soit l'oxygène, soit des composés minéraux ou organiques (oxydes d'azote, sulfate, DMSO, CO_2, Fe(III), fumarate, chlorobenzoate...). Quand l'oxygène n'est pas l'accepteur, on considère le phénomène comme une respiration anaérobie si il est vérifié qu'il y a bien couplage avec la construction d'un potentiel de membrane, l'ATP étant formé secondairement à partir de celui-ci par l'ATP synthase.

Respiration anaérobie - Respiration utilisant un accepteur terminal autre que O_2.

Restriction (nucléase de) - Voir Nucléases de restriction.

Rhizobactéries - Terme général désignant les bactéries qui s'associent aux racines des plantes et stimulent la croissance végétale. Ce sont le plus souvent des assimilateurs d'azote : *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Acetobacter diazotrophicus*.

Rhizoplane - Surface d'une racine, entourée par la rhizosphère.

Rhizosphère - Région du sol placée au contact immédiat d'une racine, colonisée par des bactéries et des champignons à la faveur des substances émises par la plante et de l'oxygène qu'elle émet. La plante bénéficie en retour d'éléments élaborés par la microflore, notamment des composés azotés et des phosphates solubilisés par leurs partenaires.

Rhodanèse - Transférase répandue dans la nature comme principal agent d'utilisation du thiosulfate (EC 2.8.1.1). Catalyse : $S_2O_3^{2-} + A^- \rightarrow SO_3^{2-} + AS^-$, où A est un accepteur.

Rhodococcus erythropolis - Bactérie appartenant au groupe des actinomycètes, montrant des potentialités intéressantes dans les biodégradations et applicables au traitement des eaux usées. Ses parois renferment des glycolipides aux propriétés floculantes, dont la partie lipidique a des acides gras ramifiés à longue chaîne (mycoliques et mycoléiques).

Rhodophytes - Algues rouges, caractérisées par leur pigment appartenant au groupe des phycobilines, la phycoérythrine. Celle-ci absorbe dans le bleu et constitue une adaptation à la vie à plus grande profondeur.

Ribonucléotide réductase - Catalyse le passage du ribose au désoxyribose dans les nucléoside-diphosphates (NDP), ou dans les nucléoside-triphosphates (NTP). La réduction du ribose sur le carbone 2', essentielle à la formation des précurseurs dans la synthèse de l'ADN, s'effectue par un mécanisme radicalaire. Dans les organismes aérobies, la réductase de structure R_1R_2 (Type I) comporte au repos un radical porté par une chaîne latérale de tyrosine de R2, stabilisé par un centre bimétallique contenant du fer (Fe–O–Fe). Le site actif contenant deux thiols essentiels est dans R1. Ce dispositif n'existe qu'en aérobiose, car la présence de dioxygène est indispensable à la préparation du radical, catalysée par le centre bi-métallique. Dans les organismes anaérobies, l'activation fait appel à d'autres solutions. Le substrat est un NTP. Dans le type II, le radical est porté par un thiol, et l'activation utilise l'adénosyl-cobalamine comme donneur de radical. Dans le type III le radical est sur glycine, et l'activation est faite à l'aide de S-adénosyl-méthionine. Il faut une "activase", qui catalyse le passage de la propriété radicalaire du donneur vers la ribonucléotide réductase. Ce mécanisme existe dans l'activation de la benzylsuccinate synthase.

Ribosomes - Particules cytoplasmique, présentes aussi dans les mitochondries et plastes, où s'effectue la traduction de l'ARN messager en protéines. Composées de deux parties inégales désignées par leur coefficient de sédimentation, 30 S et 50 S chez les procaryotes mitochondries et plastes, 40 S et 60 S chez les eucaryotes. Voir ARNr.

Rickettsie - Bactérie Gram-négative non mobile de petite taille, obligatoirement intracellulaire.

RIESKE (protéine de) - Ferrédoxine particulière caractérisée par un noyau [2Fe-2S] où les atomes de fer sont liés par deux résidus d'histidine et deux de cystéine, au lieu de 4 résidus cystéine. Motif de séquence consensus associé : $CPHx_{15\text{-}17}CxxH$. Plus précisément : C-x-H-R-[G/A]-xxxxxxxx-N-xxxxx-C-x-[F/Y]-H (naphtalène dioxygénase et dioxygénases de la classe dite IIB). Le potentiel redox de ces protéines est plus élevé que celui des autres ferrédoxines (– 150 mV à près de 200 mV). Une protéine de RIESKE est présente dans les chaînes respiratoires aérobies au niveau du complexe bc_1 et dans la chaîne des transferts d'électrons associée à certaines oxygénases et oxydases. On a identifié un noyau [2Fe-2S] lié par 3 Cys et 1 Asp chez l'hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*.

RMN - Résonance Magnétique Nucléaire (ou **NMR** dans la littérature anglo-saxonne). Outil essentiel de la chimie moderne et qui a pris une grande importance en imagerie médicale. La RMN est d'une très grande utilité dans l'analyse structurale des protéines. Technique fondée sur le couplage entre spins nucléaires de noyaux à nombre atomique impair au sein d'une même molécule : hydrogène (RMN du proton ou ^1H), du carbone-13, du phosphore-31 et du fluor-19. Les développements modernes permettent un accroissement du pouvoir de

résolution, notamment par l'emploi de champs intenses, le traitement informatique du signal et la transformée de FOURIER, ainsi que par de nombreuses astuces technologiques. L'emploi du deutérium facilite l'analyse des échanges de protons, l'analyse cinétique rapide, et l'étude des réactions asymétriques. Parmi d'autres applications on peut citer l'analyse structurale et cinétique sur des molécules enrichies en carbone-13, les dosages *in vivo* des phosphates, de l'ATP et autres nucléotides dans la cellule par le phosphore-31, l'emploi de molécules fluorées comme substrats ou inhibiteurs et le marquage artificiel de protéines par le fluor. Par exemple la RMN du fluor-19 est une technique permettant de suivre la biodégradation de composés fluorés par une population de micro-organismes.

RND - *Resistance-nodulation-cell division*. Antiporteurs (sortie du substrat, entrée de protons), ubiquistes chez les bactéries, archaebactéries, eucaryotes, formant une superfamille structurale avec des subdivisions. Leur structure comporte de grandes chaînes polypeptidiques de 700 à 1300 acides aminés, 12 segments transmembranaires et un gros domaine extracytoplasmique. Les deux moitiés de la séquence ont une ressemblance qui laisse supposer qu'il y a eu duplication et fusion à partir d'une séquence ancestrale. Les substrats sont des métaux lourds (Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}), des antibiotiques et médicaments (*multi-drug*), des lipopolysaccharides et facteurs de nodulation, des stérols et des protéines. Le transporteur proprement dit ou A est associé à un facteur B faisant un pont entre les deux membranes chez les Gram-négatifs, et une troisième protéine externe ou C. Les transporteurs de type RND sont actionnés par la Δp, et non pas par l'ATP. Pour les distinguer des transporteurs ABC actionnés par l'hydrolyse de l'ATP, on les désigne comme complexes CBA ! Le colibacille renferme au moins 6 antiporteurs de type RND actionnant l'exportation de diverses substances dont des polysaccharides, des antibiotiques et des produits toxiques. Ces systèmes RND ont un rôle important dans la résistance multiple des bactéries aux antibiotiques.

RPE - Résonance Paramagnétique Electronique (ou **EPR** dans la littérature anglo-saxonne). Une technique essentielle pour l'observation des entités moléculaires contenant des électrons non appariés ou plus généralement un "moment de spin". Appropriée en particulier à l'examen des formes radicalaires (par exemple dans les flavoprotéines), des centres contenant des métaux de transition : fer, nickel, cobalt, appliquée également au cuivre. La RPE est très utile pour déterminer l'état d'oxydoréduction du métal et les variations de son environnement organique au cours d'une réaction enzymatique dans les protéines héminiques, les dioxygénases…

RpoN - Voir Sigma-54.

RpoS - Facteur d'amorçage, appelé aussi sigma-S, KatF, sigma-38. Fonctionne à la base d'un vaste régulon, qui concerne le passage de la phase de croissance à la phase stationnaire, certains changements morphologiques, l'osmoprotection, un renforcement de la protection de l'ADN, une résistance accrue à une carence nutritionnelle, la tendance à l'adhésion et d'autres fonctions. C'est typiquement une réponse au passage à des conditions moins favorables. Chaque opéron commandé par RpoS est en même temps soumis à des régulations par d'autres protéines agissant de concert. Le facteur RpoS est lui-même régulé, par exemple par OmpR. Son activité comme facteur d'amorçage est augmentée par un facteur spécial DsrA qui n'est pas une protéine mais un ARN de 87 nucléotides. Cet ARN forme une structure hybride en s'appariant localement à l'ARN messager du gène *rpoS*, provoquant un déroulement local qui facilite la traduction de cet ARN par les ribosomes. La synthèse de RpoS est donc soumise à une régulation au niveau traductionnel.

Rubisco - Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RBP), caractéristique de l'assimilation du CO_2 par le cycle de CALVIN. La réaction entre RBP et CO_2 produit deux molécules de phosphoglycérate. Présente dans les chloroplastes, les carboxysomes des cyanobactéries, et le cytosol des bactéries photo-autotrophes. Son abondance vient en contrepartie de la lenteur relative de son cycle catalytique. C'est aussi une oxygénase utilisant O_2 sur le même substrat, et cette réaction (RBP + CO_2 $\rightarrow$ phosphoglycérate + phosphoglycolate) qui entre en compétition avec la fixation de CO_2 est à l'origine de la photorespiration. La Rubisco possède sauf exception une structure quaternaire L_8S_8. Les sous-unités L ont chacune un site actif. Pour que celui-ci puisse fonctionner, une activation préalable consiste à greffer CO_2 sur un résidu de lysine. La fonction carbamyle ainsi formée facilite l'insertion d'un ion

magnésium, chélaté par lui et d'autres sites environnants. Cet ion métallique participe ensuite à l'action catalytique. La carbamylation de la lysine est sous la dépendance de la Rubisco activase, fonctionnant en hydrolysant de l'ATP.

Rubrédoxines - Petites protéines de couleur rouge faisant office de ferrédoxines, mais dépourvues de soufre acido-labile : un ou deux ions Fe sont coordonnés directement par 4 soufres de cystéine. Potentiel moins bas que celui des ferrédoxines. La première isolée, chez *Clostridium pasteurianum*, a un E'° de – 57 mV. Communes chez les sulfato-réducteurs, comprenant une désulforédoxine (voir aussi Rubrérythrine) et chez les phototrophes.

Rubrérythrine - Transporteur d'électrons à fer non héminique décrite chez *Desulfovibrio vulgaris*. Les deux sous-unités identiques renferment chacune du fer dans un environnement de type rubrédoxine, et un noyau bimétallique rappelant celui de l'hémérythrine ou de la ribonucléotide réductase. Ce noyau contient du fer hexacoordonné et du zinc tétracoordonné, chaque métal étant lié à un motif GluxxHis (SIEKER LC et coll. (2000) *J. Biol. Inorg.* **5** : 505-513).

Rumen - La panse ou compartiment principal de l'estomac des ruminants, où s'effectue l'essentiel des transformations et fermentations de la matière végétale.

S-adénosyl-méthionine (AdoMet) **-** Cofacteur de nombreuses réactions de méthylation dans le métabolisme cellulaire, portant notamment sur les acides nucléiques, les glucides, les lipides. La perte du méthyle transforme l'AdoMet en S-adénosyl-homocystéine, précurseur à son tour dans diverses synthèses (polyamines, alcaloïdes...).

Saprophyte - Organisme décomposant les matières organiques pour s'en nourrir.

Séléniate réductase - Réduit le séléniate (SeO_4^{2-}) en sélénite (SO_3^{2-}). Le potentiel redox correspondant (+ 0,44 V) est proche de celui du couple nitrate/nitrite. Etudiée comme enzyme respiratoire en anaérobiose sur séléniate chez *Thauera selenatis*, où elle apparaît comme périplasmique. L'enzyme trimérique localisée dans le périplasme contient Mo, au moins un centre fer-soufre et un hème B. Ne réduit pas le nitrate, le nitrite ou le chlorate (SCHRODER I et coll. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** : 23765). Une activité séléniate réductase est également reconnue chez d'autres espèces bactériennes, comme *Escherichia coli* et *Rhodobacter sphaeroides*.

Sélénium - Elément placé au-dessous du soufre dans la classification périodique, donnant des anions similaires (séléniate, sélénite, sélénure). Les sélénols (R-SeH), contrairement aux thiols, sont déprotonés à pH neutre, et leur potentiel redox est plus bas. Le sélénium peut remplacer certains atomes de soufre dans les noyaux fer-soufre et dans la cystéine, qui devient sélénocystéine (voir Sélénocystéine), laquelle est incorporée dans la séquence de quelques enzymes. Exemples : formiate déshydrogénase (en particulier en anaérobiose), xanthine déshydrogénase, glycine réductase (*Clostridium*) et la glutathion peroxydase (mammifères, oiseaux), hydroxylase de l'acide nicotinique (*Clostridium barkeri*). Le sélénium est un oligo-élément indispensable aux animaux, mais très toxique à forte dose.

Sélénocystéine - Acide aminé similaire à la cystéine, mais où le soufre est remplacé par du sélénium. Son incorporation au cours de la traduction est déterminée par le codon-stop UGA, qui est reconnu au sein d'une boucle formée par l'ARN messager à l'aide d'un ARNt particulier, acylé par la sérine en séryl-ARNt (la réaction d'activation de l'acide aminé avant mise en place dans la chaîne protéique naissante). Cet ARNt chargé est alors transformé en sélénocystéyl-ARNt par remplacement de S avec Se. Le donneur de sélénium est le sélénophosphate. Il est sensible à O_2. C'est donc une opération réservée aux organismes vivant en anaérobiose ou capables de protéger le sélénophosphate contre l'oxygène. Il est formé à partir de sélénure et d'ATP par une sélénophosphate synthétase, répandue chez les procaryotes et eucaryotes. Dans le règne animal, le sélénium est un composant essentiel de la glutathion peroxydase.

Semi-aldéhyde - Composé à chaîne ouverte porteur à ses extrémités d'un carboxyle et d'une fonction aldéhydique.

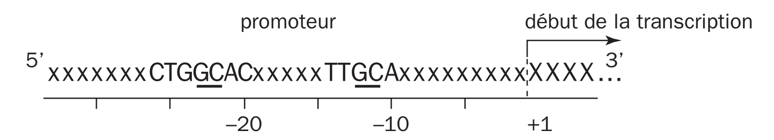
Séquences d'acides aminés - Voir Résidus.

Sérovars - Souches d'une même espèce montrant des propriétés antigéniques distinctes.

Shuffling - Brassage et recombinaison de séquences. Voir DNA shuffling.

Sidérophores - Composés organiques hydrosolubles à faible masse moléculaire, émis par les micro-organismes et capables de piéger le fer(III) avec une très haute affinité. Ils renferment en général un motif catécholique, ou une fonction hydroxamate. La disponibilité du fer et la compétition entre espèces pour sa récupération est un facteur biologique important. De tels composés existent chez les plantes, notamment les Graminées, sous forme de phytochélatines.

Sigma-54 - Facteur de transcription se liant à l'ARN-polymérase et permettant la reconnaissance des promoteurs placés en amont de certains gènes impliqués dans divers métabolismes spécialisés, dont le métabolisme azoté, soit pour la réduction du nitrate et des oxydes d'azote, soit pour l'assimilation de l'ammonium ou du glutamate dans les conditions de carence en azote, ou encore pour l'assimilation de l'azote. Appelé aussi RpoN, NtrA, GlnF. C'est notamment au niveau de ce système qu'intervient l'activateur de transcription NifA chez les assimilateurs de N_2. Les promoteurs reconnus par sigma-54, dont dépendent beaucoup de gènes de l'azote, ont cette structure consensus :



Sigma-70 - Voir Facteur d'amorçage.

Signal (peptide) **-** Portion N-terminale d'une protéine, longue en général d'une vingtaine d'acides aminés, caractérisant les produits destinés à être exportés au dehors du cytoplasme, soit dans le reticulum endoplasmique (eucaryotes), soit dans le périplasme ou le milieu extérieur chez les procaryotes. Cette portion à caractère hydrophobe s'insère dans la membrane et facilite le transit du reste de la chaîne. Elle est ensuite détachée par un signal peptidase. Les gènes des protéines soumises à un tel transit ont ainsi une séquence initiale supplémentaire codant pour des acides aminés qu'on ne retrouve pas dans le produit définitif. Voir aussi Translocon.

Signal peptidase - Voir Signal.

Sirohème - Ferri-isobactériochlorine. Ferriporphyrine analogue à l'hème B, caractéristique de plusieurs systèmes enzymatiques. La nitrite réductase des chloroplastes (EC 1.7.7.1), monomérique, utilise la ferrédoxine réduite comme donneur, celle des bactéries et des champignons (EC 1.6.6.4), un homodimère, emploie NAD(P)H. Les sulfite réductases des cyanobactéries et plantes (EC 1.8.7.1) utilisent une ferrédoxine réduite, celles des bactéries emploient NADPH (EC 1.8.1.2) ou NADH (EC 1.8.1.-). Ces enzymes ont une partie flavoprotéique, une autre contenant un centre fer-soufre attaché à un sirohème.

Sonde (nucléique) **-** Polynucléotide (ADN ou ARN) de séquence donnée, naturelle ou artificielle, susceptible de s'hybrider avec tout acide nucléique porteur localement de la séquence complémentaire. Le repérage de l'hybride se fait par marquage : les sondes utilisées marquées contiennent un isotope radioactif ou un groupe fluorescent. Parfois les sondes utilisées sont porteuses d'un groupe chimique supplémentaire (biotine) ou d'une enzyme (peroxydase). L'hybride est alors détecté *in situ*, sur un gel d'électrophorèse ou même dans la cellule entière. Une application extrêmement importante est la méthode d'amplification PCR.

Soret (bande) **-** Bande d'absorption des protéines héminiques dans la région 405-430 nm, déplacée à de plus grandes longueurs d'onde par le monoxyde de carbone. C'est la plus intense des cytochromes, ou bande γ, mais la moins spécifique.

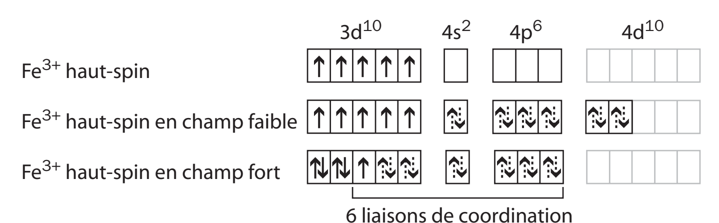
SOS (Réponse) **-** La soudure anormale de deux bases de l'ADN par action photochimique, notamment de deux thymines, crée une anomalie qui induit la synthèse d'enzymes de

réparation, commandées par une vingtaine de gènes chez *E. coli*. La protéine RecA provoque l'hydrolyse d'un répresseur, LexA (qui est elle-même le répresseur du gène de RecA), action qui est le point de départ de cette induction. Les protéines UvrA, B et C excisent la partie malade sur le brin d'ADN, l'ADN polymérase I synthétise à nouveau la partie manquante et une ligase fait la soudure. Parmi les protéines induites figurent aussi UmuC et UmuD, qui font partie des enzymes de réparation, et des protéines mutagènes comme MutS, MutL et MutM.

Soufre acido-labile - Soufre présent sous forme d'ions sulfure dans les noyaux fer-soufre, où ils sont liés à Fe. Contrairement au soufre appartenant aux résidus cystéine, ces ions sulfure sont éliminés sous forme de H_2S par un traitement acide.

SOUTHERN (ou *SOUTHERN blot*) **-** Méthode rappelant le papier buvard. L'ADN dénaturé après électrophorèse sur plaque d'agarose est transféré sur un filtre de nitrocellulose, sur lequel on peut obtenir une hybridation avec un ADN complémentaire ou une sonde nucléique. SOUTHERN est le nom d'un chercheur. Pour l'humour, la technique de ce transfert étant applicable aussi pour l'ARN ou les protéines, on parle respectivement de Northern et de Western.

Spin (Haut spin, Bas spin) **-** Concerne en biochimie surtout l'état électronique du fer et autres métaux de transition, mais également les radicaux libres formés par des facteurs organiques, par exemple les flavines. Les électrons périphériques du fer tendent à se répartir dans les orbitales de niveau supérieur en restant non appariés (état haut-spin). Quatre ou six liaisons de coordinence sont établies avec des atomes donneurs de doublet. Le "champ ligand" exercé tend à installer ces doublets dans les orbitales externes en refoulant les électrons du fer vers les couches plus basses. C'est ce qui se passe dans l'état bas-spin du fer, notamment quand le champ est établi par 6 donneurs forts selon la géométrie de l'octaèdre régulier (spin = 1/2 dans Fe(III)).



Dans l'état haut spin du fer, l'environnement de coordination est incomplet (5 liaisons), asymétrique, ou établi avec des donneurs faibles, de telle sorte que les électrons périphériques du fer restent non appariés dans leurs orbitales $3d^{10}$ (spin = 5/2 dans Fe(III)), et les électrons des atomes donneurs occupant des orbitales à un niveau supérieur. L'état de spin du fer est observé en RPE et renseigne sur la géométrie et le nombre des liaisons autour du fer.

SoxS - Protéine de stress, codée par l'opéron *soxRS* qui contrôle le régulon du stress par oxydation (présence de superoxyde, de peroxyde, pression partielle forte en O_2...) , soit une quarantaine de gènes. La réaction est déclenchée par SoxR, qui active la production de SoxS.

Spores - Cellules spécialisées assurant la survie en conditions adverses et la dissémination. Les *Bacillus* et *Clostridium* engendrent des endospores (une cellule → une spore) particulièrement résistantes à la chaleur, à la dessiccation, aux radiations. Les endospores ont une teneur réduite en eau, ont une paroi épaisse et contiennent du dipicolinate de calcium. Les conidies formées par certains actinomycètes sont des spores asexuées à paroi mince produites par la fragmentation des hyphes et non pas à l'intérieur de sporanges. On les appelle aussi conidiospores. Les ascospores des champignons ascomycètes et basidiospores des basidiomycètes sont des spores sexuées (après méïose) formées dans des sporanges (asques, basides).

Stéaryl-ACP Δ9 désaturase - Transforme l'acide stéarique en acide oléique par la création d'une double liaison. Voir Désaturase.

Streptomycètes - Bactéries Gram-positives présentes dans le sol et les eaux, formant des filaments ramifiés et des hyphes aériennes formateurs de spores ou conidies. Elles produisent une gamme étendue d'antibiotiques dont quelques pour cent ont des applications thérapeutiques. Certaines espèces font de la géosmine, responsable de l'odeur du sol humide et du compost.

Stress - Situation créée par un agent physique ou chimique agressif : température élevée, changement de salinité ou de pH, action d'une substance toxique ou phénomène de carence. La réponse à un état de stress est régulée sur le plan génétique par un réseau d'interactions sophistiqué. *E. coli* a 3 gènes de stress, *marA*, *robA* et *soxS* (voir SoxR). Ce sont des activateurs de transcription pour au moins une dizaine de gènes formant un vaste régulon, déterminant notamment la synthèse d'une superoxyde dismutase, d'une endo-nucléase de réparation de l'ADN, d'une aconitase, d'une fumarase, d'une NADPH-ferrédoxine oxydoréductase, d'une glucose-6P-déshydrogénase et de OmpF (expliqué à la rubrique OmpR). À cette liste s'ajoutent les protéines du choc thermique (Hsp60, Hsp70), et ArcAB pour la résistance aux solvants organiques (hexanol). Ces protéines de stress augmentent en même temps la résistance aux antibiotiques hydrophobes et aux métaux lourds. Chacune (MarA, SoxS...) voit sa synthèse commandée par une protéine régulatrice (MarR, SoxR) servant de détecteur du signal. Ainsi en l'absence de tout stimulus, MarR bloque la synthèse de l'activateur MarA. Cette inhibition est levée par divers stimuli (antibiotiques, aspirine, paraquat, dinitrophénol, cyclohexanol...). Une fois produite, MarA active le régulon *mar* comportant de nombreux gènes sur le chromosome de *E. coli*.

Stromatolites - Formations fossiles lamellées pouvant remonter au Précambrien, dues à la précipitation du carbonate de calcium sur des manteaux cyanobactériens par couches successives. Les stromatolites sont abondants surtout avant la fin du Primaire, mais peuvent se former encore actuellement (tufs du littoral de Shark Bay, Australie occidentale).

Structures secondaires - Replis formés dans la structure des protéines par des liaisons hydrogène formées entre deux points de la chaîne principale. Celle-ci est formée par la répétition du motif –NH–(R)CH–CO–, R étant une chaîne latérale d'acide aminé. Les plus importantes sont les hélices alpha, les barreaux bêta et les tournants de la chaîne. Les structures secondaires sont les premières à s'établir quand la chaîne passe de l'état dénaturé (déroulé) à la forme native, et forment une importante charpente structurale. L'expression est étendue aux acides nucléiques, en particulier l'ARN, dont la chaîne se replie par des liaisons hydrogènes établies entre bases ou entre différents points de la molécule et formant une architecture spécifique. Le plan des structures secondaires dans l'ARN des ribosomes a conservé des caractères constants dans l'évolution des êtres vivants (voir ARN 16S).

Structure tertiaire - Représente l'organisation générale de la chaîne polypeptidique dans l'espace, englobe les structures secondaires, est consolidée par des liaisons non covalentes entre les chaînes latérales d'acides aminés (liaisons H, ponts ioniques...) ou des liaisons covalentes, notamment les ponts disulfures venant de l'oxydation de deux thiols (cystéine).

Structure quaternaire - On désigne ainsi l'association dans une même protéine de plusieurs chaînes polypeptidiques, identiques ou non, reliées par des liens covalents ou non covalents. Un nombre immense d'enzymes possèdent une structure quaternaire, dont la fonction s'interprète par différents critères :

- Stabilisation de la structure générale. L'association se fait parfois par des bras et replis plus ou moins importants qui permet à une sous-unité de mieux s'attacher à une voisine (la catalase est dans ce cas) ;
- L'accolement des sous-unités ou protomères permet de soustraire des sites hydrophobes du contact du solvant.
- L'accolement de deux chaînes contribue souvent à former un site catalytique, dont les motifs essentiels appartiennent à l'une et à l'autre ;
- La structure moléculaire totale fonctionne comme un ensemble intégré, où les mouvements conformationnels d'une partie se répercutent sur la structure du reste. Ce principe est très important dans les protéines allostériques, mais pas seulement car dans les structures quaternaires détentrices de plusieurs sites catalytiques, le fonctionnement de l'un peut infléchir le fonctionnement des autres ;

- Une structure quaternaire facilite le transfert d'électrons dans une protéine d'oxydo-réduction possédant plusieurs sites (flavines, fer-soufres, métaux...) ;
- Une structure quaternaire conditionne parfois l'association de la protéine avec d'autres macromolécules. Cet effet est très important pour les protéines régulatrices associées à des acides nucléiques ou agissant comme nucléases de restriction.

Sulfato-réducteurs - Bactéries utilisant le sulfate comme accepteur respiratoire anaérobie, utilisent des composés organiques ou H_2 comme sources d'électrons.

Sulfite réductase - Enzyme catalysant la réduction à 6 électrons de l'hydrosulfite en sulfure.

Superoxyde - Radical et anion, provient de la réduction mono-électronique de l'oxygène diatomique ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$), notamment au cours des réactions catalysées par les oxydases.

Superoxyde dismutase (SOD) **-** Catalyse la réaction : $2\ O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$. Il y en a trois sortes :
- avec Fe (bactéries, cyanobactéries, chloroplastes) ;
- à manganèse (bactéries, cyanobactéries, archaebactéries, mitochobndries ;
- à cuivre et zinc (cytoplasme des eucaryotes, certains chloroplastes).

Le dosage utilise la propriété du superoxyde de réduire le cytochrome c ou des colorants accepteurs, ou d'oxyder l'adrénaline en adrénochrome. Le superoxyde est facilement engendré *in vitro* en faisant fonctionner la xanthine oxydase.

Super-tours - Structure hélicoïdale formée par torsion de la double hélice d'ADN dans un sens ou dans l'autre (super-tours positifs et négatifs). Les super-tours ont pour effet un entortillement de la double hélice et sont engendré par la réplication de l'ADN. Les topo-isomérases sont chargées de les contrôler. L'une des plus importantes est la gyrase.

Swarming - Essaimage. Au sein d'une population, faculté de certaines cellules bactériennes de se déplacer rapidement dans une matrice de polysaccharides, leur permettant de coloniser une grande suface en ensembles denses au sein desquels existent une certaine différenciation. Le swarming, caractéristique de certaines espèces comme les *Proteus*, aboutit à de véritables ensembles pluricellulaires avec division du travail, et obéit à un mécanisme complexe.

Symbiose - Cohabitation étroite et stable de deux espèces tirant un bénéfice mutuel de leur association, mais pouvant se développer séparément. Les interactions peuvent aller d'un simple commensalisme à un mutualisme, mais les différents facteurs ne sont pas toujours bien cernés expérimentalement, et l'emploi de cette terminologie n'a cessé d'évoluer. La symbiose peut apparaître parfois comme une relation obligatoire, et on la qualifie alors de symbiose mutualiste. Le parasitisme se détache comme un concept distinct lorsque les bénéfices de l'association sont à sens unique.

Synergie - Association de deux organismes pouvant se développer séparément, mais trouvant un bénéfice dans leur présence simultanée.

Synporteur - Transporteur faisant traverser la membrane par un substrat en même temps et dans la même direction qu'un autre élément, le plus souvent un ion, un proton...

Synthase - Enzyme effectuant une synthèse sans l'intervention d'une source d'énergie du type ATP, et se distinguant ainsi des ligases ou synthétases. Les synthases (classe 4 des enzymes) se distinguent par la nature de la liaison concernée : C–C, C–N, C–S...

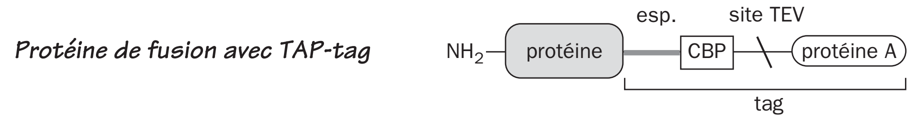
Synthétase - Voir Ligase.

Syntrophisme - Développement simultané de deux organismes ou davantage, tirant parti d'un échange de substances nécessaires à leur croissance. Par exemple deux germes ont besoin de deux facteurs de croissance A et B. Supposons que le premier est capable de synthétiser A tandis que le deuxième peut fabriquer B. Sur un milieu dépourvu à la fois de A et de B, les deux organismes ne peuvent se développer que s'ils sont présents ensemble. C'est un cas de synergie. Voir aussi Mutualisme.

Système à deux composants - Voir Régulation à deux composants.

TAP-tag - Marqueur par *Tandem Affinity Purification*. Méthode permettant de purifier des complexes muti-protéiques applicable à une recherche systématique dans un extrait cellulaire,

mise au point à l'origine pour la levure de bière. La purification est déterminée par une protéine "hameçon" dont le gène a été modifié par recombinaison génétique, de façon à lui faire porter du côté N- ou C-terminal une séquence supplémentaire ou *tag* (étiquette) reconnue par chromatographie d'affinité. Cette séquence obtenue artificiellement forme une cassette génétique amplifiée par PCR, comporte un espaceur (esp.), un module correspondant à une protéine de liaison de la calmoduline (CBP), un site facile à hydrolyser par la protéase TEV (voir TEV), et la protéine A (voir Protéine A). La cassette est bordée par de courtes séquences destinées à orienter la recombiaison homologue. Les cellules de levure sont transformées par plasmide contenant cette cassette, et les recombinants sont sélectionnés, cultivés, leurs protéines extraites. Un produit modifié par la *tag* est alors reconnu en chromatographie d'affinité sur des billes de gel contenant des IgG (à cause de la protéine A) ou de la calmoduline. L'emploi de la protéase TEV hydrolyse l'amarre et permet d'éluer facilement le produit à purifier. Cette méthodologie en expansion comporte déjà diverses variantes brevetées.



TCDD - Tétrachloro-*p*-dioxines (voir Dioxines).

TCE - Trichloro-éthylène, $ClCH{=}CCl_2$.

TEF - Toxicity equivalency factor. Dans une famille de composés toxiques (dioxines), le TEF de chacun est sa toxicité comparée à celle d'un produit de référence (2,3,7,8-TCCD, TEQ = 1). Par exemple avec un TEF de 0,1, il faut 10 fois plus de ce composé pour avoir le même effet qu'avec le poison de référence.

TEQ - Toxic equivalence quotient. Dans un mélange de dioxines, on multiplie la concentration en g de chaque constituant par son TEF, et la somme de tous les produits partiels obtenus donne le TEQ. Une façon de comparer la toxicité d'un mélange hétérogène à celle du composé de référence, pour les dioxines le 2,3,7,8-TCCD. Un mélange de 1 pg TEQ est aussi toxique que 1 pg de 2,3,7,8-TCCD.

TEV (Protéase) **-** Protéase à cystéine du *Tobacco Etch Virus*, outil d'analyse en biochimie des protéines : topologie des polypeptides et des protéines membranaires, hydrolyse entre glutamine et sérine la séquence Glu-x-x-Tyr-x-Gln-Ser. Cette séquence introduite dans une construction polypeptidique (notamment en chromatographie d'affinité) permet de la scinder spécifiquement.

Terpènes - Hydrocarbures d'origine végétale, tirés des huiles essentielles. Par extension, leurs dérivés alcooliques, aldéhydiques et cétoniques.

Tétrahydrofolate - Cofacteur transporteur d'unités mono-carbonées chez les eubactéries et les eucaryotes, aux niveaux d'oxydation du formiate (10-formyl-FH4 ou 5,10-méthényl-FH4), du formaldéhyde (5,10-méthylène-FH4) et du méthanol (5-méthyl-FH4). Dans la formule partiellement détaillée du tétrahydrofolate, les deux positions hydrogénées substituables en 5 et 10 sont en gras, les différentes combinaisons sont représentées schématiquement :

Point d'entrée important des unités mono-carbonées dans le métabolisme cellulaire, le stade méthylène-FH4 se rencontre par exemple dans le cycle sérine des méthylotrophes. Le FH4 dérive de l'acide folique et contient dans sa formule une partie PABA (voir PABA).

Tétrahydrométhanoptérine - Cofacteur particulier des méthanogènes, ressemblant au tétrahydrofolate et fonctionnant sur le même principe dans les réductions successives de l'unité mono-carbonée.

Terprédoxine - Ferrédoxine de la famille de la putidarédoxine, trouvée chez un *Pseudomonas*, participant à l'oxygénation du terprénol.

Thermophile - Micro-organisme dont la température optimale de croissance est au-dessus de 60°C . Il n'y a généralement pas de croissance au-dessous de 40°C. Voir aussi Hyperthermophile. Parmi les eucaryotes, l'espèce la mieux connue est *Cyanidium caldarium* (40 à 57°C), apparentée aux rhodophytes et présente dans les sources chaudes acides du monde entier.

Thiamine-pyrophosphate - Voir PLP.

Thio-autotrophe - Organisme tirant son énergie de l'oxydation du soufre et des produits sulfurés, et son carbone à partir du CO_2. C'est un chimiolitho-autotrophe.

Thiocyanate - Voir Cyanate (et son analogue thiocyanate).

Thiorédoxine - Protéine d'oxydoréduction à faible masse moléculaire, comportant à l'état réduit deux thiols proches l'un de l'autre formant un pont disulfure à l'état oxydé. Les électrons proviennent du NADPH par une thiorédoxine réductase, et sont transmis à une enzyme acceptrice, par exemple la ribonucléotide réductase.

Thiosulfate - $S_2O_3^{2-}$ ($S–SO_3^{2-}$). C'est l'hyposulfite des photographes.

Titane - Le citrate de Ti(III) est utilisé expérimentalement dans les réactions anaérobies nécessitant le maintien d'un très bas potentiel. Il est préparé à pH 8 à partir de $TiCl_3$ et de citrate de Na en milieu totalement désaéré. Le potentiel de demi-réduction varie avec le pH. Il est de – 480 mV à pH 7. Une élévation du pH entre 2 et 10 abaisse progressivement le potentiel en fonction de la loi de NERNST. En jouant sur le pH et le rapport Ti(IV)/Ti(III), on dispose d'un moyen pour conduire des tests anaérobies à différents potentiels redox.

TMAO - Triméthylamine-N-oxyde. Produit régulateur du volume cellulaire et stabilisateur des protéines contre l'action de l'urée chez les poissons, se dépose sur les écailles, réduit par les bactéries en triméthylamine qui est responsable de l'odeur de poisson avarié.

TMAO réductase - Système enzymatique à molybdène utilisant le TMAO comme accepteur terminal dans une chaîne respiratoire anaérobie. Dans *E. coli*, est aussi une DMSO réductase.

TMMO - Voir TMAO.

TMPD - 2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-phenylene diamine. Réducteur des cytochromes c, son oxydation par les chaînes respiratoires bactériennes comportant un cytochrome c le colore en bleu. Base des tests "oxydase +" (présence d'une cytochrome c oxydase) dans les tests microbiologiques.

TNT - 2,4,6-Trinitrotoluène.

Toluène - Méthylbenzène.

Topo-isomérase - Enzyme capable d'introduire ou d'enlever des supertours dans l'ADN. Les topo-isomérases de type 1 fonctionnent par coupures à un seul brin et change le nombre de supertours d'une unité par cycle catalytique, tandis que les topo-isomérases de type 2, dont la gyrase, font des coupures sur les deux brins, changent les supertours de deux unités par cycle.

Tourbe - Matière organique accumulée par lente décomposition des débris végétaux en anaérobiose permanente et en milieu gorgé d'eau. La tourbe est poreuse, peut dense, renferme des fibres végétales et de la lignine faiblement transformées. La tourbe des cuvettes mal drainées des montagnes provient de débris de mousses (sphaignes), est généralement très acide et pauvre en azote. Ailleurs la tourbe est souvent formée à partir de graminées et cypérassées, peu acide, plus riche en azote et en constituants minéraux.

TPP - Thiamine-pyrophosphate. Coenzyme dérivé de la vitamine B, activateur des groupes aldéhydiques comme celui qui naît par décarboxylation sans oxydation du pyruvate ou du 2-oxoglutarate. Le TPP forme une liaison transitoire avec les aldéhydes substrats et sert d'activateur dans le transfert sur un accepteur du groupe aldéhydique pouvant comporter un seul atome de carbone (formaldéhyde), deux (acétaldéhyde, glycolaldéhyde) ou davantage. Lorsque le substrat est cétonique, la molécule est rompue en libérant un fragment aldéhydique qui se lie transitoirement au PLP, notamment dans la réaction des transcétolases.

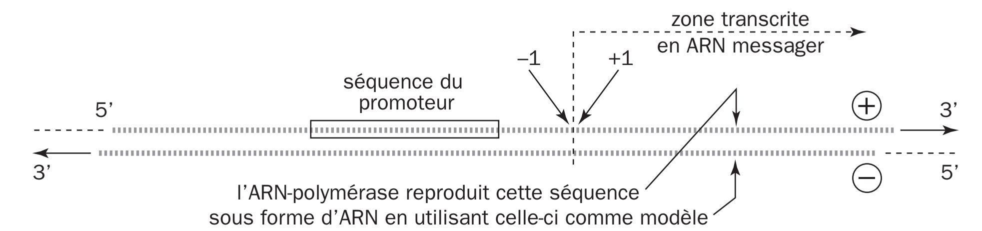
Traduction - Assemblage d'un polypeptide par les ribosomes, selon une séquence traduite à partir de l'ARN messager en fonction du code génétique.

Transaminase - Autre nom donné à une aminotransférase.

Transamination - Réaction catalysée par les transaminases ou aminotransférases, où un acide aminé et un oxoacide (cétoacide) réagissent réversiblement selon :

$$R_1–CH(NH_2)–COOH + R_2–CO–COOH \rightleftharpoons R_1–CO–COOH + R_2–CH(NH_2)–COOH$$

Transcription - Synthèse d'ARN dont la séquence reproduit celle de l'un des deux brins de l'ADN modèle. La quasi totalité de l'ARN cellulaire est engendré par transcription. La transcription d'un segment d'ADN en ARN est amorcée par l'ARN-polymérase en aval immédiat d'un promoteur, reconnu par un facteur d'amorçage ou facteur sigma. Le mécanisme de cette reconnaissance détermine le sens dans lequel l'ARN-polymérase va progresser le long de l'ADN, en fabriquant un ARN complémentaire de l'un des brins d'ADN. La séquence reproduite est celle du brin signifiant noté "+" sur le schéma. L'ARN-polymérase se sert de la séquence complémentaire marquée "–" comme modèle, comme le négatif d'un cliché photographique permet de réaliser des épreuves positives. Le démarrage de la transcription qui suit le mécanisme de reconnaissance du promoteur nécessite une micro-dénaturation locale de l'ADN pour la mise en place du premier nuclétide de l'ARN, correspond au "complexe ouvert". La fonction des activateurs de transcription est souvent de favoriser l'établissement de celui-ci. L'ARN-polymérase parcourt alors le brin modèle de 3' vers 5' (de gauche à droite sur le schéma), alors que le brin signifiant, qui est orienté en sens inverse, est parcouru de 5' vers 3'.



L'ARN formé est utilisé directement comme ARN messager (protéobactéries) ou après plusieurs modifications dans le noyau des eucaryotes (et parfois chez les archaebactéries), l'une d'elles étant l'élimination ou épissage des introns. L'ARN messager bactérien représente la séquence d'un ou plusieurs gènes (un opéron), alors que chez les eucaryotes le messager représente généralement un seul gène. Le produit primaire de la transcription subit alors de nombreuses modifications avant de devenir un ARN messager fonctionnel : apparition d'une structure spéciale ou coiffe à l'extrémité 5', pose d'un segment de poly-A à l'extrémité 3', élimination des introns, méthylation à certaines positions. Ces changements ont lieu en grande partie dans le noyau cellulaire. Lorsque le brin signifiant de l'ADN est pris comme modèle d'une transcription, l'ARN formé est complémentaire de l'ARN messager normal et peut s'apparier à lui (comme les deux brins d'ADN) en bloquant son fonctionnement. Ce type d'ARN est dit ARN anti-sens et peut avoir une fonction régulatrice.

Transduction - Transmission d'information génétique d'une cellule à l'autre par l'intermédiaire d'un phage. La transduction est généralisée (n'importe quel gène est transporté) ou limitée (seuls sont transmis des gènes adjacents au site d'intégration du prophage).

Transformation - Modification génétique d'une cellule par pénétration d'ADN libre et intégration de celui-ci dans le génome. Les cellules capables d'être transformées sont dites compétentes, à certains stades (*Bacillus subtilis*) ou permanente (*Haemophilus influenzae*).

Translocon - Complexe membranaire multiprotéique permettant le passage de macromolécules à travers une membrane. Défini initialement dans l'étude du transport des polypeptides à travers la membrane du réticulum endoplasmique, il comprend une signal peptidase, une protéine de reconnaissance du signal (voir rubiques correspondantes), et une protéine désignée par Tram qui traverse 6 ou 8 fois la membrane et forme probablement un canal. Le terme de translocon a été étendu au complexe assurant le transport d'ADN entre deux cellules au cours de la conjugaison bactérienne. Cet appareil de transport bactérien est peut-être un dispositif ancestral aménagé chez diverses espèces pathogènes qui ont en commun d'injecter de l'ADN ou des protéines chez des eucaryoyes : *Agrobacterium*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*. Les spécialistes désignent ce mode de "sécrétion" vers un cellule partenaire comme sécrétion de type IV (CHRISTIE PJ (2001) *Mol. Microbiol.* **40** : 294-305).

Transport actif - Mécanisme permettant à un composé substrat de traverser la membrane en remontant un gradient de concentration, ce qui nécessite un apport d'énergie ATP ou Δp. Exemple : pompage d'un substrat extérieur et accumulation dans la cellule. Voir aussi Perméase, Synporteur, Antiporteur.

Transporteurs ABC - A*TP-binding cassettes*. Systèmes de transport actif répandus chez les procaryotes et les eucaryotes. Fonctionnent comme importateurs dans la cellule chez les procaryotes, archaebactéries comprises, fonctionnent dans l'un ou l'autre sens (efflux) chez les eucaryotes. Les pièces fondamentales sont deux domaines transmembranaires, fusionnés ou non en une même protéine et responsables du passage du substrat à travers la membrane, et deux domaines hydrophiles capables de lier et d'hydrolyser l'ATP. L'hydrolyse est l'agent moteur du transport. En association sont une ou plusieurs protéines extracytoplasmiques (dans le périplasme chez les Gram-négatifs). Le transporteur ABC le plus connu est celui qui importe le maltose chez *E. coli*. Une protéine de liaison périplasmique (MalE), deux protéines membranaires (MalF et MalG) et deux molécules de l'ATPase MalK composent ce système. Les protéines transporteurs ABC de cette catégorie sont très répandues chez toutes les bactéries, font partie d'une vaste famille caractériée par des homologies structurales entre les différents domaines, s'exercent sur des sucres, des acides aminés, des vitamines, des phosphates et des ions métalliques. Les transporteurs ABC de type efflux exportent le plus souvent des molécules organiques complexes ou variées, notamment des peptides dans le réticulum endoplasmique de la cellule animale. Chez les bactéries ce sont des antibiotiques, des polysaccarides capsulaires, des lipopolysaccharides et constituants de la paroi, des protéines de la couche S, des sidérophores et des toxines. Tous ces transporteurs se ressemblent par leur domaine de liaison des nucléotides et sont apparentés à diverses enzymes spécialisées dans des modifications de l'ADN, comme les hélicases (LINTON KJ & HIGGINS CF (1998) *Molecular Microbiol.* **28** : 5-13 ; YOUNG J & HOLLAND IB (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1461 -** 177-200).

Transposase - Enzyme codée par un transposon, catalyse l'excision de celui-ci (effet *cis*) et l'insertion dans le nouveau site en agissant comme intégrase.

Transposition - Déplacement d'un segment d'ADN d'une position à une autre, soit dans la même molécule d'ADN, soit entre deux molécules différentes (par exemple entre plasmides ou entre chromosome et plasmide).

Transposon - Séquence désoxyribonucléique ayant la propriété de se déplacer sur l'ADN, soit en bloc (excision puis insertion ailleurs), soit après avoir subi une réplication (une copie reste en place, l'autre s'installe ailleurs). Les séquences mobiles sont appelées *IS* (séquences d'insertion), renferment les gènes d'une ou plusieurs enzymes nécessaires à la transposition, ou transposases, et sont bordées aux extrémités par deux courtes séquences répétées et inversées (15 à 25 bp). Un transposon peut loger des gènes étrangers (par exemple des gènes de résistance) dans un élément *IS* (transposon simple) ou avec deux *IS* de même orientation ou orientés en sens opposés.

Trichome - Rangée de cellules restant attachées les unes aux autres après divisions successives, et mobiles d'un seul tenant. Les trichomes servent souvent à la dissémination des cyanobactéries filamenteuses et des cellules du genre *Beggiatoa*.

Tungstène - De numéro atomique 74 (W), analogue chimique du molybdène (Mo, n° 42), présent dans les archaebactéries hyperthermophiles et méthanogènes, dans certains Gram-positifs (*Clostridium thermoaceticum*), des Gram-négatifs anaérobies (*Desulfovibrio gigas*) ou aérobies (*Methylobacterium*). Dans 4 séries d'enzymes : formiate déshydrogénase, formyl-méthanofurane déshydrogénase, acétylène hydratase, oxidoréductases catalysant réversiblement l'oxydation des aldéhydes (comme le formaldéhyde et le glycéraldéhyde-3-phosphate) en présence d'une ferrédoxine. Toutes les enzymes à tungstène catalysent une insertion d'oxygène à partir de H_2O dans une liaison C-H. Le tungstène est l'élément caractéristique des aldéhyde-ferrédoxine oxydoréductases, logé dans un cofacteur de type molybdoptérine et associé à un groupe [4Fe-4S]. Le tungstène de la formyl-méthanofurane déshydrogénase peut être lié à un dinucléotide MGD. Les tungsto-enzymes sont présentes surtout chez des organismes thermophiles ou hyperthermophiles, et le tungstène y est toujours lié à un cofacteur similaire à celui des enzymes à molybdène (comme mononucléotide), tandis que Mo dans les espèces mésophiles est le plus souvent au sein d'un cofacteur dinucléotidique. Lorsque le tungstène intervient dans une réaction où s'observe également le molybdène, il opère à potentiel redox plus bas que celui-ci, souvent bien au-dessous de – 400 mV. Le tungstène peut remplacer le molybdène dans les molybdo-enzymes, et conduit en général à une forme inactive. Cette action inhibitrice du tungstate constitue un indice expérimental utile.

Turbidostat - Culture continue faite avec un montage analogue à celui du chémostat, le volume étant constant, mais l'apport de milieu et le prélèvement sont effectués à vitesse variable contrôlée par asservissement automatique de façon à maintenir la densité cellulaire à un niveau constant.

UAS - *Upstream activating sequence*. Zone d'attachement spécifique d'un activateur de transcription en amont d'un promoteur, souvent à plus d'une cinquantaine de pdb. L'activateur sur l'ADN n'est éventuellement placé en contact avec le complexe d'amorçage (ARN-polymérase, facteur sigma, région du promoteur) qu'à la faveur d'une courbure en épingle à cheveux sur l'ADN, avec l'aide d'un élément supplémentaire du type IHF (voir IHF).

UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket, ou flux ascensionnel dans un lit de boues anaérobies. Procédé d'épuration des effluents par méthanisation.

Ubiquinols - Voir Ubiquinones.

Ubiquinones - Quinones respiratoires très lipophiles (Q), portant une chaîne latérale comportant un nombre variable d'unités isoprénoïdes à 5 atomes de C (les plus courantes sont les ubiquinone-8 et ubiquinone-10, ou UQ8 et UQ10), réduites réversiblements en ubiquinols (hydroquinone QH_2). Transporteurs d'électrons souvent placés entre une déshydrogénase et un cytochrome, notamment le complexe bc1. Possibilité de transmettre les électrons un à un : $Q + e^- + H^+ \leftrightarrow$ QH (semiquinone) ; $QH + e^- + H^+ \leftrightarrow QH_2$ (ubiquinol).

UQ - Abréviation pour ubiquinone.

Uréase - Enzyme à Ni décomposant l'urée selon : $OC(NH_2)_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3$.

Uridylase - (ou uridyl transférase). Enzyme catalysant une uridylation.

Uridylation - Fixation sur un accepteur (en général une protéine) d'un nucléotide à uracile (UMP), par son phosphate. Le donneur est l'UTP, la liaison libère du pyrophosphate.

Uroporphyrinogène III - Composé tétrapyrolique linéaire (Up III) intermédiaire clé de la synthèse de toutes les porphyrines, dont il est le précurseur.

1. → 5-aminolévulinate (→ porphobilinogène → → Up III) formé de deux façons, soit à partir de glycine + succinyl-CoA soit à partir de glutamyl-ARNt.

Les voies qui divergent à partir de l'Up III :

2. → coproporphyrinogène III → → protoporphyrine IX qui sera à l'origine de l'hème B, de l'hème C de la chlorophylle ;
3. → → → sirohème, par CysG, une sirohème synthase complexe (EC 2.1.1.107) ;

4. → précorrine → → → → → → hème D1, par une cascade d'enzyme codées par le groupe des gènes *nirE* et *nirFDLGHJ* ;
5. la synthèse des corrinoïdes, cobalamines (B12).

Pour un schéma général et des références, voir l'article de WG ZUMFT (1997) *Molec. Microbiol.* **61** : 533-616.

Vadose - Région du sol non saturée en eau placée entre la nappe phréatique et la surface du sol.

Vanadium - Présent dans certaines peroxydases et nitrogénases.

Vanilline - 3-Méthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde.

Vanillique (acide) **-** Acide 3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque.

Vecteur navette - C'est un plasmide construit par recombinaison artificielle, dans lequel on a ménagé deux origines de réplication différentes dérivées de *E. coli* et de la levure ou de *E. coli* et de cellules humaines. Permet de transférer des gènes entre cellules très différentes en contournant les barrières de spécificité qui entravent la propagation des plasmides courants.

Vériatraldéhyde - 3,4,5-Triméthoxybenzaldéhyde.

Vériatrole - 1,2-Diméthoxybenzène.

Viologènes - Colorants d'oxydoréduction à très bas potentiel, utilisés expérimentalement dans des réactions anaérobies comme accepteurs d'électrons. Les plus courants sont le méthyl-viologène (1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridinium^{2+}), dont le potentiel E'° est de – 446 mV, et le benzyl-viologène. Le premier est utilisé comme herbicide sous le nom de Paraquat. Son action est celle d'un poison de la photosynthèse.

Vitamine B12 - (Voir Vitamines). À l'origine des cobamides.

Vitamines - Facteurs nutritifs organiques requis par les cellules pour leur croissance ou leur maintenance cellulaire, servant de coenzymes ou de précurseurs de coenzyme.

Biotine	H	Coenzyme de carboxylases, lié fortement par l'avidine
Cobamide	B12	Renferme du cobalt, méthylations, réarrangements
Acide folique	F	Précurseur du FH4*, transferts d'unités en C1
Niacine		Nicotinamide et nicotinate, précurseur de $(NAD(P)^+$
Acide pantothénique		Précurseur du coenzyme A
Acide *p*-aminobenzoïque		Précurseur du FH4*, transferts d'unités en C1
Pyridoxine	B6	Précurseur du pyridoxal-P, métabolisme des acides aminés
Riboflavine	B2	Précurseur des flavines : FAD, FMN
Thiamine	B1	Précurseur du thiamine pyroP (TPP), transferts d'aldéhydes

V_m - La vitesse d'une réaction enzymatique croît avec la concentration en substrat limitant, jusqu'à atteindre un plateau de saturation. La vitesse V_m atteinte est une valeur supérieure limite quand la concentration en substrat est supposée infinie. Cette valeur dépend en fait des conditions du test, mais elle est directement proportionnelle à la constante catalytique k_{cat} qui exprime le nombre de molécules de substrat par seconde. V_m est en quelque sorte le miroir de l'efficacité du site actif de l'enzyme. Voir K_m et MICHAELIS (loi de).

Xanthine oxydase - Molybdo-enzyme animale catalysant les oxydations successives : hypoxanthine → xanthine → acide urique. Celui-ci est un produit d'excrétion azoté insoluble, abondant dans le guano des oiseaux, métabolisé selon les espèces en différents produits de dégradation dont l'urée. L'enzyme contient, outre le cofacteur à molybdène deux centres fer-soufre et du FAD.

XAS - X-ray absoption spectroscopy.

Xénobiotique - Composé étranger à la chimie des êtres vivants, habituellement engendré par les activités humaines.

XXR - Dans un super-intégron, séquence répétée (70-80% d'identité) servant de cible à l'intégrase IntI correspondante. Nomenclature destinée à répertorier les différents types de séquence. La première lettre X désigne l'initiale du nom de genre, la deuxième celle de l'espèce R veut dire repeat (répétition). Ainsi pour *Vibrio cholerae* c'est VCR, pour *V. mimicus*

VmiR, pour *V. metschnikovii* VmeR pour *Listonella pelagia* LPR et ainsi de suite. Une nomenclature sur le même principe désigne l'intégrase, le nom étant terminé par *intlA*, ou *intlA* et *intlB* (quand il y en a deux).

Xylanes - Hétéropolymères de xylose abondants dans les parois végétales secondaires des dicotylédones et dans les tissus primaires des monocotylédones. Dans le bois leur proportion peut atteindre 25%. Les xylanes purs constitués uniquement d'un enchaînement d'unités xylose par liaisons β-1,4 sont relativement rares. En général ces polymères sont ramifiés, plus ou moins irrégulièrement, par des chaînons latéraux renfermant de l'arabinofuranose, de l'acide O-méthylglucuronique, de l'arabinose et autres constituants. Les xylanes ont des liens covalents avec la lignine.

Xylènes - *ortho-*, *méta-* et *para-*diméthylbenzène.

Xyloglucanes - Hétéropolysaccharides abondants dans les hémicelluloses de la paroi primaire des dicotylédones. Enchaînement d'unités de glucose liées en β-1,4 comme dans la cellulose, et portant latéralement d'autres unités glucidiques formant des motifs périodiques. La présence de ces derniers permet des pontages complexes entre les chaînes, empêchant la formation d'édifices cristallins par ponts hydrogène comme dans la cellulose pure. L'intérêt de la structure pontée des xyloglucanes vient surtout de leur rôle dynamique dans la croissance de la paroi. Les barreaux entre chaînes sont hydrolysés puis reformés à des endroits différents par des enzymes, notamment une glycosyl transférase dont l'action permet ainsi de remanier le maillage.

Zinc - Oligo-élément indispensable à tous les êtres vivants, nécessaire au fonctionnement de nombreuses enzymes, qui sont le plus souvent des déshydrogénases et oxidoréductases, et surtout des hydrolases. Le métal [Zn(II)] ne change pas de degré d'oxydation. Intervient de deux façons, soit comme stabilisant de la structure tertiaire des protéines, soit comme pôle réactif. Dans le premier cas, Zn^{2+} est le plus souvent tétracoordonné par des atomes d'azote (histidine) de soufre (cystéine), ou d'oxygène. Dans le second cas, il stabilise le positionnement d'un substrat dans le site enzymatique par des liaisons de coordinence, intervient dans le cycle catalytique (comme acide de Lewis). Ces effets sont souvent plus ou moins simultanés. Dans l'appareil génétique, le zinc logé dans les "doigts à zinc" participe à la construction de métalloprotéines liées à l'ADN et actives dans la régulation de l'expression des gènes. Le zinc intervient aussi comme anti-oxydant direct ou indirect. Notre organisme contient 2-4 g de zinc, soit presque autant que de fer, et dans le sang la plus grande partie est liée à l'anhydrase carbonique des globules rouges. Une homéostasie règle la teneur du zinc dans les cellules. La capture du zinc se fait par des transporteurs découverts chez les bactéries, levures, plantes et mammifères, appartenant à une même superfamille structurale, les protéines ZIP. Chez *Escherichia coli*, le zinc est importé par un transporteur de type ABC : une protéine périplasmique ZnuA, une ATPase ZnuC et une protéine membranaire ZnuB. La levure a également un transport de zinc, mais plus complexe que celui du colibacille.

INDEX

B

C

D

E

G

H

I

K

N

O

P

Q

R

S

Table des matières